

**Untersuchung der Bindungskinetiken von
rekombinantem, humanem knochenmorphogenetischen Protein
mit Hilfe der totalen inneren Reflexions-
fluoreszenzspektroskopie
unter Berücksichtigung
des Photobleachings und Fluoreszenzquenchings**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctorum rerum naturalium
Dr. rer. nat.

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Michael Meißner
aus Oberhausen (Rheinland)

**Institut für Physiologische Chemie
der Universität Duisburg-Essen
Universitätsklinikum Essen**

2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 2009 bis Juni 2014 im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. P. Jennissen am Institut für Physiologische Chemie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

Tag der Disputation: 15.12.2014

Gutachter: Prof. Dr. H. P. Jennissen
Prof. Dr. S. Barcikowski

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Haberhauer

Diese Arbeit ist gewidmet meiner Tochter

Elija

„...sono ancora confuso. Ma su livello più elevato“

Enrico Fermi

1	Einleitung.....	1
2	Grundlagen.....	3
2.1	Proteine.....	3
2.2	Knochenmorphogenetische Proteine (BMP).....	4
2.3	Fluoreszenz.....	6
2.3.1	Intrinsische und extrinsische Fluorophore in Proteinen.....	8
2.3.2	Fluoreszenzeigenschaften von rhBMP-2.....	9
2.3.3	Photobleaching von Proteinen (photochemische Zerstörung)	10
2.3.4	Fluoreszenzquenching (Fluoreszenzauslöschung).....	10
2.4	Totalreflexion und evaneszente Welle.....	13
2.5	Verwendung der evaneszenten Welle zur Anregung.....	16
2.6	Berechnung der Oberflächenkonzentration an Grenzflächen bei TIRF-Experimenten.....	18
2.7	Massentransport.....	24
2.8	Adsorption, Adsorptionshysterese und Gleichgewichtszustände.....	27
2.8.1	Adsorptionsisothermen.....	31
2.8.1.1	Langmuir-Isothermen.....	31
2.8.1.2	Freundlich-Isothermen.....	32
2.8.1.3	Temkin-Isothermen.....	34
2.8.1.4	Weitere Isothermen.....	34
2.8.2	Gitterstellen- und Ligandenbindungsfunktionen - Kooperativität bei Adsorptionen.....	34
2.8.3	Das Cersel-Modell für die Proteinadsorption.....	35
2.9	Ausbildung und Wirkung einer Nanoschicht.....	39
2.10	Randwinkel.....	43
3	Material, Geräte und Methoden.....	47
3.1	Chemikalien und Reagenzien.....	47
3.2	Geräte.....	48
3.3	Methoden.....	48
3.3.1	Das TIRF-Rheometer.....	48
3.3.2	Reinigung der Meßzelle.....	53
3.3.3	Herstellung der Pufferlösungen.....	53
3.3.4	Reinigung und Funktionalisierung der Quarzglasplatten.....	53
3.3.4.1	Reinigung der Quarzglasplatten mit Chromschwefelsäure.....	54
3.3.4.2	Behandlung der Quarzglasplatten mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung..	54

3.3.4.3	Behandlung der Quarzglasplatten mit (3-Aminopropyl)-triethoxysilan und mit Trichlorhexylsilan.....	54
3.3.4.4	Beschichtung der Quarzglasplatten mit Poly-DL-laktid durch Spincoating....	55
3.3.4.5	Aufbau von wechselnden Schichten aus Polyglutamat und Poly-L-lysin.....	55
3.3.5	Analytische Methoden.....	55
3.3.5.1	Randwinkelmessungen.....	55
3.3.5.2	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von 5-Hydroxy-L-tryptophan und rhBMP-2 sowie der Gesamtfluoreszenz von 5-Hydroxy-L-tryptophan....	56
3.3.5.3	Bestimmung des Proteingehaltes in Lösungen nach Lowry.....	58
3.3.5.4	Quantifizierung von rhBMP-2 mittels Radioiodmethode.....	59
3.3.6	Rekombinantes humanes knochenmorphogenetisches Protein (rhBMP-2).....	59
3.3.7	Verwendete Oberflächen.....	60
3.3.8	Messung von Ankunfts-, Adsorptions- und Desorptionskinetiken.....	62
3.3.8.1	Vorbereitung der Meßzelle.....	62
3.3.8.2	Allgemeine Bedingungen zur Einstellung des TIRF-Rheometerarrangements und allgemeine Verfahrensweisen.....	62
3.3.8.3	Messung von Ankunfts kinetiken von 5-Hydroxy-L-tryptophan in der TIRF-Meßzelle.....	63
3.3.8.4	Durchführung von Adsorptionen.....	63
3.3.8.5	Durchführung von Desorptionen.....	64
3.3.8.6	Bufferflush.....	65
3.3.8.7	Untersuchung der Fluorezenz von adsorbiertem rhBMP-2 nach einer Verweildauer von 47 Stunden auf der Oberfläche.....	65
3.3.9	Photobleachexperimente.....	65
3.3.10	Adsorption von radioaktiv markiertem rhBMP-2 am TIRF-Rheometer zur Bestimmung der Quenchfaktoren.....	65
3.3.11	Desorption von radioaktiv markiertem rhBMP-2.....	66
3.3.12	Rechenprogramm und statistische Behandlung der Meßdaten.....	67
4	Ergebnisse.....	70
4.1	Ankunfts kinetiken.....	70
4.1.1	Ankunfts kinetiken von 5-Hydroxy-L-tryptophan.....	71
4.1.2	Bestimmung des Initialpunktes von Ankunfts- und Adsorptions kinetiken.....	74
4.1.3	Transportlimitierte Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas.....	80
4.2	Adsorption von Proteinen an unterschiedlichen Oberflächen.....	83
4.2.1	Adsorption von rhBMP-2 an nativem Quarzglas.....	83
4.2.2	Adsorption von rhBMP-2 an (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APS).....	84
4.2.3	Adsorption von rhBMP-2 an Trichlorhexylsilan (THS).....	85

4.2.4	Adsorption von rhBMP-2 an Poly-DL-laktid (PDLLA).....	86
4.2.5	Adsorption von rhBMP-2 an Polyelektrolytmultilayern (PEMs) bestehend aus wechselnden Schichten von Polyglutamat (PGA) und Poly-L-lysin (PLL). 87	
4.2.6	Zusammenfassende Übersicht zu den Adsorptionsexperimenten.....	89
4.3	Photobleaching und Fluoreszenzquenching.....	90
4.3.1	Photobleaching von rhBMP-2 bei Adsorptionen.....	90
4.3.2	Oberer und unterer Grenzbereich des Photobleachings bei Adsorptionen.....	95
4.3.3	Fluoreszenzquenching von rhBMP-2 bei Adsorptionen.....	99
4.3.4	Fluoreszenzverhalten von adsorbiertem rhBMP-2 nach einer Verweildauer von 47 Stunden.....	102
4.3.5	Untersuchung der Fluoreszenz bei Desorptionen mit unterschiedlichen Belichtungsraten und Kontrollexperiment.....	103
4.4	Berechnung der Oberflächenkonzentration von rhBMP-2 aus der Fluoreszenz.....	109
4.4.1	Berechnung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz von rhBMP-2-Lösungen mit dem Bufferflush nach Hlady.....	109
4.4.2	Berechnung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz von rhBMP-2-Lösungen mit der Kreuzmethode (ohne Bufferflush).....	114
4.4.3	Vergleich von Adsorptionskinetiken nach Umrechnung der Fluoreszenzen in die Oberflächenkonzentrationen nach Hlady (Bufferflush) und nach der Kreuzmethode.....	117
4.4.4	Einfluß des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz aus verschiedenen Berechnungsmethoden auf die kinetischen Größen.....	120
4.5	Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas und an hydrophobem PDLLA.....	120
4.5.1	Bestimmung der Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas.....	121
4.5.1.1	Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas.....	121
4.5.1.2	Adsorptionsisothermen für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas.....	128
4.5.1.3	Fluoreszenzverlust bei der Desorption von rhBMP-2 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.....	130
4.5.1.4	Fluoreszenzverlust bei der Desorption von rhBMP-2 in Abhängigkeit vom Elutionspuffer.....	132
4.5.2	Bestimmung der Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLLA.....	134
4.5.2.1	Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLLA.....	134
4.5.2.2	Isoherme für die apparente Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLLA am TIRF-Rheometer.....	136
4.5.2.3	Fluoreszenzverlust bei der apparenten Desorption des rhBMP-2 von hydrophobem PDLLA.....	137

5	Diskussion.....	138
5.1	Ausbildung von Nanoschichten an verschiedenen Oberflächen und exponentiell verlaufende Adsorptionen.....	138
5.2	Bestimmung des Initialpunktes bei Adsorptionskinetiken.....	142
5.3	Photobleaching von rhBMP-2 bei Adsorptionen.....	143
5.4	Fluoreszenzquenching von rhBMP-2 bei Adsorptionen.....	144
5.5	Einfluß des UV-Lichtes bei Desorptionen.....	146
5.6	Vergleich von Adsorptionskinetiken für die Bindung von rhBMP-2 an Oberflächen mit unterschiedlicher Hydrophilie.....	156
5.7	Berechnung der Oberflächenkonzentration von rhBMP-2.....	159
5.8	Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas und PDLA.....	161
5.8.1	Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas.....	162
5.8.2	Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLA.....	172
5.8.3	Vergleich der Bindungskonstanten von rhBMP-2 an Quarzglas und PDLA mit Bindungskonstanten anderer Proteine.....	173
5.9	Vergleich von Adsorptionsstudien zwischen TIRF- und SPR-Spektroskopie..	175
6	Zusammenfassung.....	177
7	Literatur.....	180
8	Anhang.....	197
8.1	Abkürzungen.....	197
8.1.1	Allgemeine Abkürzungen.....	197
8.1.2	Formelzeichen.....	198
8.2	Publikationen.....	205
8.3	Lebenslauf.....	206
8.4	Erklärung.....	207
8.5	Danksagung.....	208

1 Einleitung

In der Medizin finden Implantate eine weitreichende Anwendung. Dabei ersetzen sie in der Regel einfache mechanische und physikalische Aufgaben [1], welche der Organismus wegen eines singulären Defektes im Gewebe oder einer chronischen Erkrankung nicht mehr leisten kann. Implantate müssen viele Voraussetzungen wie z. B. mechanische und fertigungstechnische Erfordernisse erfüllen und biokompatibel sein [2]. Die Biokompatibilität ist von entscheidender Bedeutung, da beim Einbringen eines Implantates in den Organismus als erste Reaktion eine Adsorption von Proteinen an der Implantatoberfläche stattfindet [3-5] und hier die Vorentscheidung fällt, ob das Implantat biokompatibel ist [6]. Aus diesem Grunde ist die Herstellung von Oberflächen, „...auf der nur ein oder wenige ausgesuchte Proteine mit gezielter Wirkungsweise gebunden sind, damit eine Lenkung der Gewebereaktion in Richtung Selektivität und Spezifität möglich wird“, von großer Bedeutung [7]. Implantate werden beschichtet, um sie als „Drug Delivery System“, bei dem Medikamente über einen definierten Zeitraum freigesetzt werden [2], zu verwenden oder um ein gezieltes Wachstum von Gewebe auf der Implantatoberfläche zu induzieren.

Die Kenntnis über die Vorgänge bei der Adsorption von Proteinen an Oberflächen und das Wissen über Konformationsänderungen der adsorbierten Proteine sowie ihrer Affinitäten tragen zum Verständnis bei der Reaktion von Zellen an in den Körper eingebrachte Implantate bei. Bei hochaffinen Grenzflächen und bei der Adsorption von großen Molekülen führt die Transportlimitierung dazu, daß die gemessenen Adsorptionskinetiken und die daraus berechneten Bindungskonstanten verfälscht werden. Durch die Transportlimitierung wird zunächst nur der Diffusionsvorgang gemessen und nicht die eigentliche Adsorption. Für die Untersuchung der Adsorption von Proteinen an Oberflächen steht eine Vielzahl von Methoden [8,9], wie z. B. die Quarzkristallmikrowaage (Quartz Crystal Microbalance, QCM) [10], die Ellipsometrie [11-13], die abgeschwächte Totalreflexion (Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy, ATR) [14], die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [15-19] oder die Totale Innere Reflexionsfluoreszenzspektroskopie (TIRF) [20-22] zur Verfügung. Bei diesen Meßmethoden verlaufen die transportlimitierten Adsorptionen über mehrere Minuten bis hin zu Stunden, siehe z. B. [23-29]. Wegen der Transportlimitierung verlaufen die Kinetiken am Anfang linear und können deshalb nicht an exponentielle Funktionen angepaßt werden. Entsprechend sind die Adsorptionsisothermen aus Adsorptionsexperimenten mit den o. a. Methoden nur eingeschränkt für die Ermittlung der Bindungskonstanten zu gebrauchen. Morton und Myszka entwickelten für die SPR ein Global Fit [18,30], daß die Anpassung von transportlimitierten Adsorptionskinetiken ermöglichte. Lin und Hlady [31] entwickelten ein Computerprogramm, das die Berechnung der

Geschwindigkeitskonstanten aus transportlimitierten Adsorptionskinetiken durch die Verwendung von experimentell bestimmbar Parametern ermöglichte. Da die Bestimmung einiger Parameter, wie z. B. die Interaktionskonstanten [4,32,33], die Diffusionskoeffizienten und die Dicke der Nernstschen Diffusionsschicht [34] recht mühselig ist, lag es nahe, die Transportlimitierung zu beeinflussen. Bei der SPR wird versucht, die Transportlimitierung durch die Optimierung der Zellgeometrie [35,36], die Erhöhung des Volumenstroms [37,38] und die Verringerung der Konzentration der Akzeptormoleküle auf der Oberfläche [39] zu reduzieren. Ein anderer Ansatz geht von der Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht aus. Die Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht durch die Erhöhung der Scherrate [34] wurde von Sanders und Jennissen am TIRF-Rheometer untersucht und führte zu einer Verkürzung der Adsorptionskinetiken [21]. Zumbrink und Jennissen [40,41] erreichten erstmals im Jahre 1998, ebenfalls am TIRF-Rheometer, die Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht von 10 μm auf 200 bis 300 nm, indem sie die Proteinlösung mit einer vorangehenden Luftblase in die Meßzelle eingeleitet haben. Dies führte zu einer drastischen Verkürzung der Adsorptionskinetiken um den Faktor 10. Die Adsorptionen waren nach höchstens 50 s abgeschlossen und zeigten keinen transportlimitierten Anteil. Dadurch konnten die erhaltenen Adsorptionskinetiken an exponentielle Funktionen angepaßt werden, so daß erstmals die Bindungskonstanten für die initialen Nukleations-Komplexe bestimmt werden konnten [22,40,42]. Bei Vorliegen einer Transportlimitierung sind die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten von Nukleations-Komplexen nicht zugänglich, da durch die eingeschränkte Diffusion, die adsorbierten Proteinmoleküle sofort die Anzahl der Bindungen zur Oberfläche erhöhen. Da bei der SPR die Adsorptionsexperimente abgebrochen werden, bevor die maximale Oberflächenkonzentration erreicht wird [18,19,43], können mit dieser Methode keine Informationen über niederaffine Nukleations-Komplexe erhalten werden.

Da derzeit Implantate, die mit rhBMP-2 (rekombinantes humanes knochenmorphogenetisches Protein) beschichtet sind, zunehmend erforscht werden, soll dieses Protein hinsichtlich seines Verhaltens auf Oberflächen untersucht werden. Es sollen Erkenntnisse über Konformationsänderungen auf der Oberfläche gewonnen werden. Für die Untersuchungen wurde ein TIRF-Rheometer [22,40-42] verwendet, bei dem Quarzglas als Modelloberfläche verwendet wurde, da es aufgrund seiner optischen Eigenschaften für die TIRF-Spektroskopie geeignet ist [44]. Da die Beobachtung der Kinetiken über die Messung der mit ultraviolett Licht (UV) zur Fluoreszenz angeregten rhBMP-2-Moleküle erfolgt, kann die gemessene Fluoreszenz durch Photobleaching und Fluoreszenzquenching verfälscht werden [45]. Aus diesem Grunde wurde der Einfluß beider Faktoren untersucht. Bei der Berechnung der Oberflächenkonzentrationen aus

der Fluoreszenz ist die Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle erforderlich, welche nur bei hohen Konzentrationen über einen Bufferflush zugänglich ist [20]. Beim Protein rhBMP-2 konnte wegen seiner geringen Löslichkeit der Bufferflush nur bei einer Konzentration durchgeführt werden. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, die keinen Bufferlusch mehr erfordert.

2 Grundlagen

2.1 Proteine

Der Begriff Protein wurde erstmals von Berzelius im Jahre 1838 eingeführt [46] und fand im Jahre 1840 den Zugang in die Literatur [47]. In der DNA (Desoxyribonukleinsäure) des Genoms ist die Information über den Aufbau der Proteine festgelegt. Man unterteilt die Proteine nach ihrem Vorkommen in drei Gruppen ein, nämlich in wasserlösliche Proteine (Vorkommen z. B. in Cytoplasma), in Membranproteine (Vorkommen z. B. in Membranen von Zellen und Mitochondrien) und in wasserunlösliche Strukturproteine (Vorkommen z. B. in Haaren, Federn u.s.w.) [48]. Der hierarchische Aufbau der Proteine wurde erstmals 1952 von Linderstrøm-Lang vorgeschlagen; er spannt sich in vier Ebenen auf, die Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartiärstruktur heißen [49]. Die Kondensation von Aminosäuren führt zu Peptiden. Die Anordnung der Aminosäuren im Peptid, als Aminosäuresequenz bezeichnet, bildet die Primärstruktur. Durch die Peptidbindungen bedingt, ergeben sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Wasserstoff nichtvicinaler Aminogruppen, so daß Teile zweier parallel liegender Peptidketten z. B. in eine sog. β -Faltblattstruktur, häufiger aber noch in eine schraubenförmige Struktur, der α -Helix, gezwungen werden und als Sekundärstruktur bezeichnet werden. Die Struktur die sich über die gesamte Peptidkette erstreckt, ist die Tertiärstruktur und kann z. B. die Form eines Knäuels annehmen. Innerhalb eines Proteins können mehrere Tertiärstrukturen zu einer Quartiärstruktur zusammenfinden. Änderungen der Strukturen wurden von Anfinsen als Konformationsänderungen erkannt [50,51]. Das größte bisher bekannte Protein, Titin, besteht aus 30000 Aminosäuren [52]. Häufig werden rekombinante Proteine eingesetzt, wie z. B. in der Medizin das Insulin bei der Indikation von Diabetes [53]. Das Gen für ein rekombinantes Protein wird in einen Vektor kloniert und in einem Modellorganismus zu dem betreffenden Protein exprimiert. Die Verfahrensweise erlaubt die Herstellung großer Proteinmengen [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde das rekombinante humane knochenmorphogenetische Protein (rhBMP-2) verwendet.

2.2 Knochenmorphogenetische Proteine (BMP)

Erstmals wurde die Induktion von Knochenneubildung im Jahre 1965 von Urist [55] nachgewiesen. Zuvor gaben schon Moss [56], Goldhaber [57], Saxen und Taivonen [58] Hinweise auf die Bildung von Knochengewebe, die durch heterogene, diffundierbare Faktoren bestimmt wird. Wenige Jahre nach Urists Veröffentlichung konnten er und seine Mitarbeiter die erneute Induktion endochondraler Osteogenese, als Eigenschaft einer demineralisierten Knochenmatrix, auf einen Glycoproteinkomplex zurückführen, den sie als knochenmorphogenetisches Protein (bone morphogenetic protein, BMP) bezeichneten. BMPs sind knocheninduzierende Wachstumsfaktoren der TGF- β -Superfamilie (Transforming Growth Factor- β) [59], welche Schlüsselfunktionen wie Chemotaxis, Mitose oder Differenzierung in Zellen ausüben [60]. Die TGF- β -Superfamilie stellt eine Gruppe multifunktionaler Mediatoren dar, die maßgeblich an der Kontrolle der Differenzierung und Proliferation der Zellen beteiligt sind [61]. Mitglieder dieser mehr als 35 Proteine umfassenden [62] Superfamilie wurden in vielen tierischen Spezies wie Mäusen, Zebras, Fischen und *Xenopus* und auch in Spezies wie *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert [63-66]. Erst zwei Jahrzehnte nach Urists Pionierarbeiten konnten einzelne Proteinkomponenten aus Komplexen isoliert werden [67-69], von welchen die ersten drei als BMP-1, BMP-2A und BMP-3 bezeichnet wurden [59,70]. Zur BMP-Familie gehören knochenmorphogenetische Proteine, osteogene Proteine (osteogenic proteins, OP), knorpelmorphogenetische Proteine (cartilage-derived morphogenetic proteins, CDMP), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (growth and differentiation factors, GDF), BMP-Homologe wie Decapentaplegic (DPP) aus *Drosophila* (Taufliegen) und glass bottom boat (GBB) aus *Xenopus* (afrikanische Krallenfrösche) [71,72]. Den BMP-Molekülen wurde überdies eine wichtige Rolle in der Bestimmung der Entwicklung der Mesenchymzellen zugeschrieben [73]. So stimulieren sie einerseits durch die Osteoblasten die Differenzierung und andererseits inhibieren sie die Differenzierung der Myoblasten. BMP und auch andere TGF- β -Proteine werden nicht nur im Skelett sondern auch im Weichgewebe exprimiert [74].

In **Abb. 1** ist ein phylogenetischer Baum der TGF- β -homologen Cytokine (*Homo Sapiens*) dargestellt, welcher über die Aminosäureausrichtung konstruiert wurde [62]. Die BMPs repräsentieren hierin über ein Drittel dieser TGF- β -Superfamilie und bilden damit die größte Untergruppe. GDF1-3 und 5 sind am engsten mit den BMPs verwandt und spiegeln wider, daß die physiologischen Funktionen nicht nur auf die Knochenbildung beschränkt sind, sondern auch auf die Proliferation und Differentiation in unterschiedlichen Geweben. Eine weitere Untergruppe bilden die transformierenden Wachstumsfaktoren TGF- β 1 bis 3, welche wahrscheinlich aus einem einfachen Vorläufer gebildet werden. Eine dritte Untergruppe wird aus β -Inhibinen

gebildet. Entfernter verwandte peptidähnliche α -Inhibinketten, wie das Anti-Müller-Hormon (AMH) [75] und das LEFTY A und B [76], bilden eine vierte Untergruppe. Die Sequenzähnlichkeit der TGF- β -Proteine im Vergleich zu BMP-2 ist in Klammern hintangestellt.

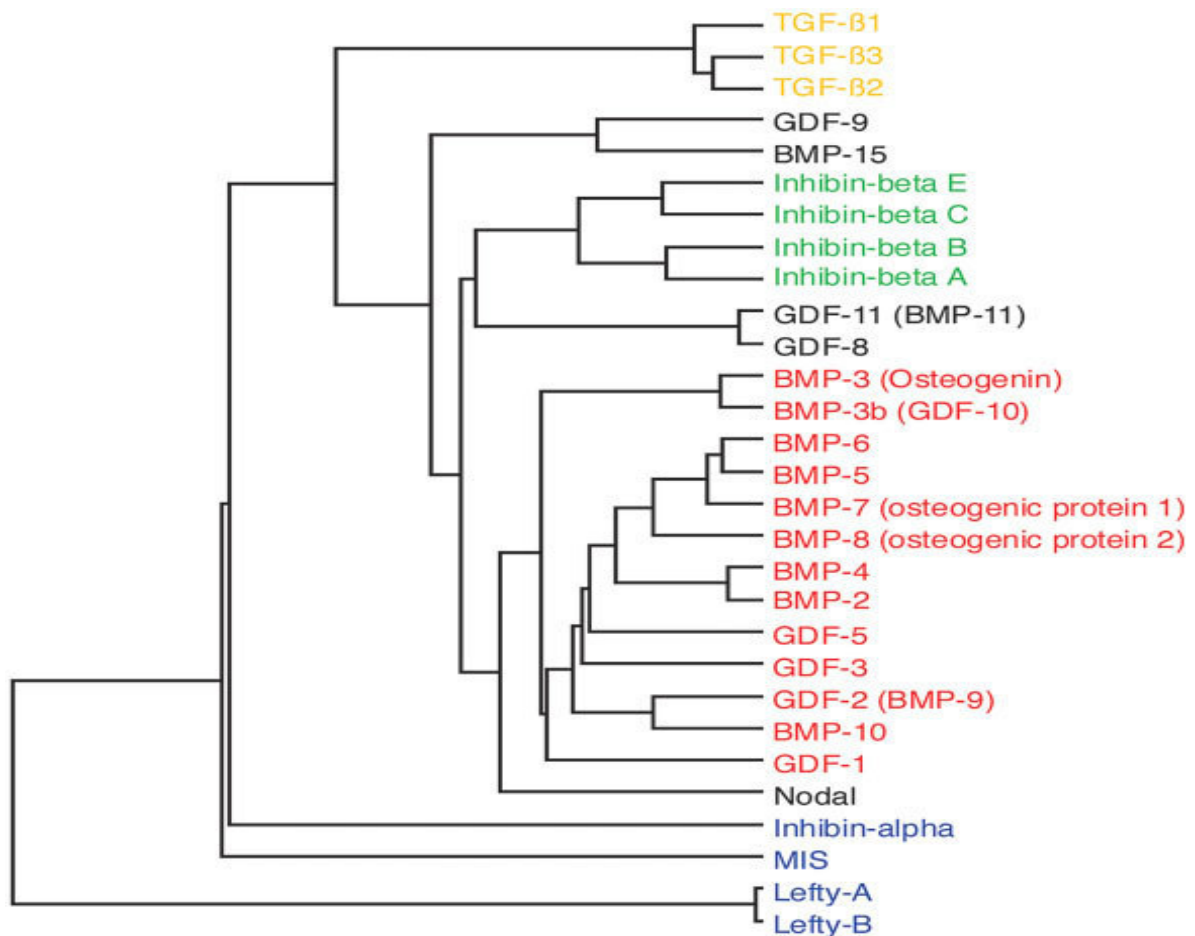


Abb. 1. Dendrogramm der TGF- β -homologen Cytokine (*Homo sapiens*). Die Längen der horizontalen Linien entsprechen der Anzahl der evolutionären Unterschiede zwischen Proteinen oder Proteingruppen, abgeleitet von der Sequenzhomologie. Die BMP-Gruppe (rot) entspricht ca. einem Drittel der TGF- β -Superfamilie und bildet somit die größte Untergruppe. GDF1-3 und 5 sind nahe den BMP-Proteinen angesiedelt. Das spiegelt den Befund wider, daß die physiologischen Funktionen der BMP-Proteine sich nicht nur auf die Knochenentwicklung reduzieren, sondern auch die Zellproliferation und Zelldifferenzierung mit einschließen. (Abbildung aus [62]).

Für die Experimente wurde biologisch aktives rekombinantes humanes knochenmorphogenetisches Protein-2 (rhBMP-2) eingesetzt, dessen Synthese es Wang erstmals aus chinesischen Hamsteroarialzellen gelang [77]. Später erfolgte die Synthese des nativen Proteins mittels des *Baculovirus*/Sf-9-Insektensystems durch Maruoka [78]. Im *E. coli*-System wurde rhBMP-2 von Ruppert [79] und von Jennissen präpariert [80]. Aus wirtschaftlichen Erwägungen hat rhBMP-2 den Vorzug gegenüber dem aus der Knochenmatrix gewonnenen phBMP-2 (p steht für purified) beim Einsatz in Kliniken bekommen. Cheng [81] verglich 14 humane BMPs (BMP-2 bis 15) und fand, daß BMP-2, BMP-6 und BMP-9 das höchste osteoinduktive Potential aufwiesen und

darüber hinaus als einzige die Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzellen der Maus (C3H10T1/2) zu Osteoblasten bewirken. Experimente in Ratten, Hunden, Kaninchen und Affen haben gezeigt, daß keine Artenspezifität vorliegt [66,82,83].

BMP-2 wird gewöhnlich in der Therapie von Knochendefekten in einem Versorgungssystem zusammen mit einem Implantat eingesetzt. Dabei wird es beispielsweise an verschiedenen Kollagenformen [84-86], Hydroxylapatit [87,88], biphasischem Calciumphosphat [89], Tricalciumphosphat [90], Poly-DL-laktid [91] oder an anderen Materialien [92-94] adsorbiert. Weiterhin wird BMP-2 auf ultrahydrophilen Titanimplantaten und anderen Metallen gebunden [95,96].

Das rhBMP-2-Monomer besitzt ein bananenförmiges Aussehen. Eine Seite des Moleküls ist konkav, während die andere konvex ist. Beide Enden besitzen jeweils einen hornähnlichen Vorsprung, der entlang der Längsachse um 180° gegeneinander verdreht ist [62], siehe **Abb. 2 A**. Das Monomer besteht aus 114 Aminosäuren [79] und besitzt als Dimer eine Molmasse von etwa 25,8 Kilodalton (kDa) [59].

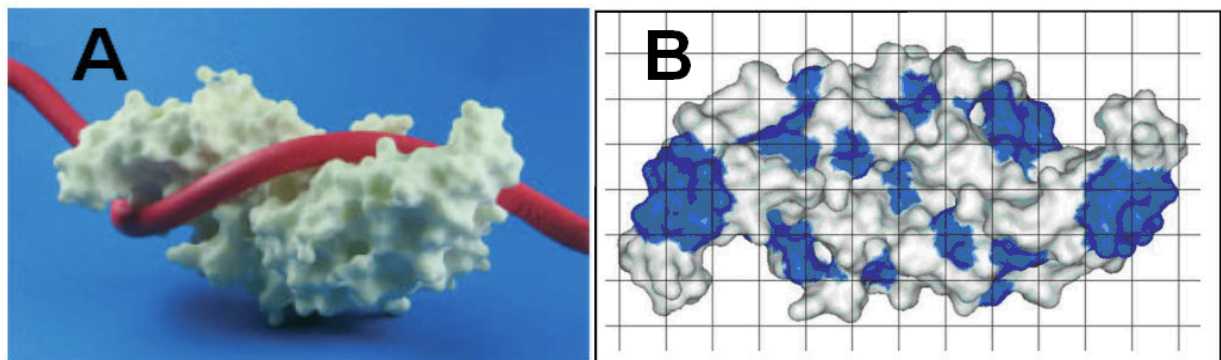


Abb. 2. *Darstellung eines rhBMP-2-Dimers. A: Antihelikale Furche (roter Schlauch) auf der konkaven Seite eines 3D-Rapid Prototyping Modells von BMP-2. (Abbildung aus [62]). B: Verteilung hydrophiler (weiß) und hydrophober Areale (blau) auf der Oberfläche eines BMP-2-Moleküls. Der Abstand der Gitterlinien entspricht 0,5 nm. (Abbildung aus [95]).*

In **Abb. 2 B** ist die Oberflächenstruktur eines rhBMP-2-Dimers abgebildet. Die hydrophilen Areale des BMP-2-Dimers sind weiß und die hydrophoben Areale sind blau dargestellt [95]. rhBMP-2 besitzt einen isoelektrischen Punkt von $IEP = 8,2 \pm 0,4$ [97].

2.3 Fluoreszenz

Die ersten, die das Phänomen beobachteten, ohne aber selbst den Begriff der Fluoreszenz zu kennen, waren Monardes und Grimaldi in den Jahren 1575 und 1665 [98]. Umfangreich wurde die Fluoreszenz im Jahre 1951 von Stoke [99] beschrieben. Bei der Anregung von Molekülen werden Photonen vom Grundzustand in höhere Schwingungszustände versetzt. Jeder Schwingungszustand besteht aus mehreren Schwingungsniveaus. Dem derart angeregten Molekül

stehen mehrere Wege offen, in den Grundzustand zu gelangen. Diese Wege wurden von Jabłoński [100] in einem Diagramm anschaulich zusammengefaßt.

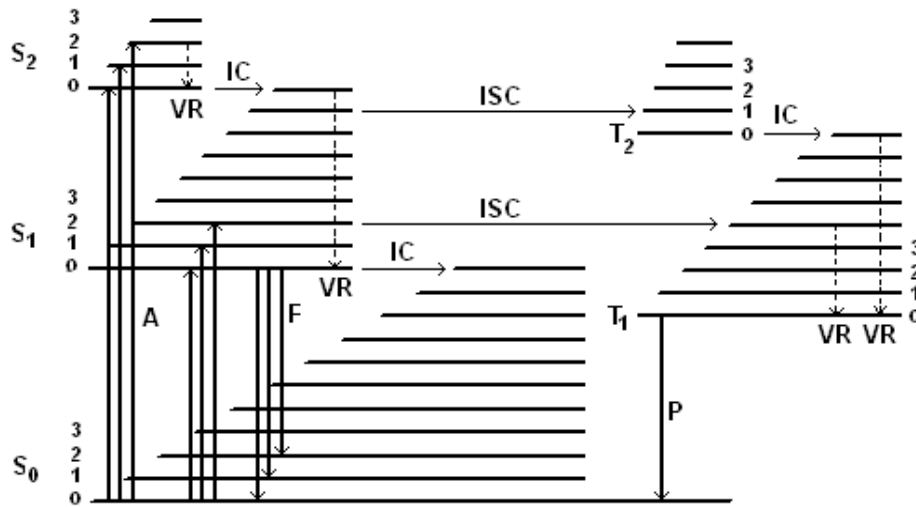


Abb. 3. Jabłoński-Diagramm zur Darstellung von Strahlungsübergängen. Abgebildet sind Singulettzustände (S_0 bis S_2) und Triplettzustände (T_1 und T_2) mit ihren Schwingungsniveaus. A: Anregung, IC: Internal Conversion, ISC: Intersystem Crossing, VR: Strahlungslose Übergänge, F: Fluoreszenz und P: Phosphoreszenz. (Abbildung aus [101]).

In **Abb. 3** ist das klassische Jabłoński-Diagramm dargestellt, anhand dessen die möglichen Wege eines Photons nachgezeichnet werden sollen. Zunächst wird ein Photon vom Singulett-Grundzustand (S_0) in einen angeregten Singulettzustand (S_1 , S_2 u.s.w.) promoviert (A). Von dort kann es in den Grundzustand unter Abstrahlung von Fluoreszenz (F) zurückfallen. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes dauert etwa 10 ns [102], kann aber, z. B. beim Tryptophan, um den Faktor 100 variieren, da sie stark von der Umgebung beeinflusst wird [103]. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist bathochrom. Weiterhin kann es strahlungsfrei vom niedrigsten Schwingungsniveau eines angeregten Singulettzustandes in das höchste Schwingungsniveau eines energetisch niedriger liegenden Singulettzustandes oder in das höchste Schwingungsniveau des Grundzustandes zurückfallen. Die Energie wird dabei als Wärme bzw. Schwingungsenergie in etwa 1 fs abgegeben. Der strahlungsfreie Übergang wird als Internal Conversion (IC) bezeichnet [102]. Von einem Schwingungsniveau eines angeregten Singulettzustandes kann das Photon unter Spinumkehr (Intersystem Crossing, ISC) in einen Triplettzustand (T_1 , T_2 u.s.w.) gelangen. Von dort kann das Photon in das unterste Schwingungsniveau eines Triplettzustandes gelangen, von dem aus es in den Grundzustand unter Abgabe von Phosphoreszenzlicht (P) zurückfällt. Das Phosphoreszenzlicht ist noch weiter in Richtung langwelligeren Lichtes verschoben als das Fluoreszenzlicht. Phosphoreszenzprozesse können bis zu mehreren Stunden dauern. Vom Triplettzustand kann das Photon erneut eine Spinumkehr

erfahren, so daß es strahlungslos in den Grundzustand zurückfällt. Innerhalb eines Singulett- oder Triplettzustandes kann das Photon strahlungsfrei von höhere in niedrigere Schwingungszustände fallen (VR).

2.3.1 Intrinsische und extrinsische Fluorophore in Proteinen

Je nach Anregungswellenlänge, können innerhalb eines Moleküls nur bestimmte Teile angeregt werden, z. B. in Proteinen die aromatischen Systeme oder das Cystein. Intrinsische Fluorophore stellen häufig natürliche Bestandteile von Proteinen dar. Solche Fluorophore sind Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Cystein [102,104,105]. In der folgenden Tabelle sind einige wichtige spektroskopische Eigenschaften dieser Fluorophore zusammengestellt. Die Angaben gelten für Wasser als Lösungsmittel bei $pH = 7,0$ [103].

Tab. 1. Spektroskopische Eigenschaften intrinsischer Fluorophore [103].

Chromophor	Anregung		Fluoreszenz		
	λ_{ex}^{max}	ϵ_{max}	λ_{em}^{max}	Φ_F	τ_F
Tryptophan	280 nm	$5600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	348 nm	0,20	2,6 ns
Tyrosin	274 nm	$1400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	303 nm	0,14	3,6 ns
Phenylalanin	257 nm	$200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	282 nm	0,04	6,4 ns
Cystin	280 nm*	$120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ *	keine Angaben in der Literatur		

λ_{ex}^{max} : Absorptionsmaximum, ϵ_{max} : Extinktionskoeffizient, λ_{em}^{max} : Emissionsmaximum, Φ_F : Quantenausbeute der Fluoreszenz und τ_F : Relaxationsdauer. * Kein Anregungsmaximum, ϵ gilt für $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$. Angaben für Cystin siehe [106].

Aus **Tab. 1** ist ersichtlich, daß die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F vom Tryptophan zum Phenylalanin deutlich abnimmt, weswegen man bei Fluoreszenzmessungen von Proteinen meistens die Anregungswellenlänge des Tryptophanmoleküls verwendet. Die Fluoreszenzquantenausbeute ist eine Funktion der Prozesse, die die Entvölkerung des angeregten Zustandes bewirken. Solche Prozesse sind spontane Emission, Quenching (Auslöschung) und Prädissoziation [107]. Da die Fluoreszenz abhängig vom pH -Wert, Analytkonzentration, Lösungsmittel und vicinalen Gruppen ist, kann man über die Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz Informationen über Konformationsänderungen von Proteinen gewinnen [106].

Um Fluoreszenzmessungen mit höheren Fluoreszenzquantenausbeuten und damit höheren Nachweisgrenzen durchzuführen, kann man in Proteine durch chemische Reaktion Fluorophore einführen. In solchen Fällen liegen extrinsische Fluorophore vor [102]. Durch solche Reaktio-

nen können aber die Adsorptionseigenschaften von Proteinen gegenüber denen unmodifizierter Proteine verändert werden [103].

Tab. 2. Spektroskopische Eigenschaften extrinsischer Fluorophore [103].*

Chromophor	Anregung		Fluoreszenz		
	λ_{ex}^{max}	ϵ_{max}	λ_{em}^{max}	Φ_F	τ_F
Ethidiumbromid	515 nm	$3800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	600 nm	1,00	26,5 ns
1-Anilinonaphthalin-8-sulfonat	374 nm	$6800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	454 nm	0,98	16 ns
Fluoresceinthiocyanat	495 nm	$42000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	519 nm	0,30	4 ns

* Zur Erläuterung der Symbole, siehe Legende zur **Tab. 1**.

Aus **Tab. 2** ist zu ersehen, daß die Fluoreszenzquantenausbeute durch die Einführung extrinsischer Fluorophore deutlich erhöht wird.

2.3.2 Fluoreszenzeigenschaften von rhBMP-2

Wie in **Kap. 2.2** erwähnt, besteht das rhBMP-2-Monomer aus 114 Aminosäuren. Das Dimer besitzt 4 Tryptophanmoleküle, 10 Tyrosinmoleküle, 6 Phenylalaninmoleküle, 2 Cysteinmoleküle und 6 Cystinbrücken (Disulfidbrücken) [108], die mit ultraviolettem (UV) Licht der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ zur Fluoreszenz angeregt werden können. Allerdings wird bei dieser Wellenlänge beim Phenylalanin nur eine sehr geringe Fluoreszenz erzeugt. Selbst beim Anregungsmaximum von $\lambda_{ex} = 257 \text{ nm}$ besitzt Phenylalanin eine sehr geringe Quantenausbeute (siehe **Tab. 1**). In [106] sind für die o. a. Fluorophore die Extinktionskoeffizienten für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ angegeben. Nach [106] setzt sich der Extinktionskoeffizient eines Moleküls aus den Extinktionskoeffizienten der einzelnen Molekülbestandteile additiv zusammen. Mit dem Lambert-Beer Gesetz können bei Kenntnis der stöchiometrischen Anteile der Chromophoren im Protein sog. Absorptionsäquivalente berechnet werden. Ein Absorptionsäquivalent ist die Anzahl von Tyrosin- oder Cystinmolekülen, die dieselbe Absorption wie ein Tryptophanmolekül besitzt. Demnach absorbieren 4,445 Tyrosinmoleküle bzw. 47,417 Cystinbrücken dieselbe Lichtmenge wie ein Tryptophanmolekül. Entsprechend nehmen 10 Tyrosinmoleküle das 2,250-fache und 6 Cystinbrücken das 0,127-fache des Anregungslichtes eines Tryptophanmoleküls auf, so daß ein rhBMP-2-Dimer zusätzlich das Anregungslicht von 2,377 Tryptophanmolekülen aufnimmt.

2.3.3 Photobleaching von Proteinen (photochemische Zerstörung)

Bei Fluoreszenzmessungen, insbesondere wenn sie über eine längere Zeit durchgeführt werden, tritt als unerwünschter Nebeneffekt das Photobleaching auf, das zu einem Absinken der Fluoreszenz führt [109,110]. Für optimierte Fluorophore wurden 10^5 bis 10^6 Fluoreszenzzyklen (Anregung und Emission) abgeschätzt [111,112], bevor sie irreversibel photochemisch zerstört werden [113]. Bei der FRAP-Methode (Fluorescence Recovery After Photo Bleaching) [114,115] ist das Photobleaching gewollt, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Fluoreszenzmessungen am TIRF-Rheometer. Für die Bindungsstudien des Proteins rhBMP-2, wurde UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 280$ nm eingesetzt. Bei dieser Wellenlänge entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [116]. Zu den ROS gehören z. B. neben dem Singulett-Sauerstoff und Stickstoffmonoxid die Hydroxyl-, Perhydroxyl- und Alkoxylradikale [117,118], welche Oxidationen hervorrufen. Besonders empfindlich gegenüber Oxidationen ist das Tryptophanmolekül [119]. Radikale können aber auch zur Quervernetzung und zur Spaltung von Peptidketten führen [120]. Man unterscheidet zwei Arten von Bleachingprozessen, dem irreversiblen und reversiblen Photobleaching. Beim irreversiblen Photobleaching führt das Anregungslicht zu einem chemischen Prozeß und trägt dafür Sorge, daß ein Molekül nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Dies kann etwa durch die Aufnahme mehrerer Photonen geschehen [121], so daß die Elektronen auf ein höheres Niveau gebracht werden. Derart angeregte Moleküle sind empfänglicher für schnelle photochemische Reaktionen und Kopplungen mit polaren Lösungsmitteln [122,123]. Zusätzlich wirken sich höhere Temperaturen begünstigend auf irreversibles Bleaching aus [123,124]. Beim reversiblen, photophysikalischen Bleaching kann die ursprüngliche Fluoreszenz wieder hergestellt werden, wenn zwischen der Bestrahlung der Moleküle Belichtungspausen erfolgen [125-127].

2.3.4 Fluoreszenzquenching (Fluoreszenzauslöschung)

Die Abnahme der Fluoreszenz kann nicht nur durch irreversibles Photobleaching erfolgen, sondern auch durch Fluoreszenzquenching, bei dem die Moleküle durch Stöße ihre Anregungsenergie strahlungslos abgeben. Beim Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) [98] wird die durch Quenchvorgänge verursachte Reduktion der Fluoreszenz über die Messung des Fluoreszenzabfalls bestimmt [128]. Beim Fluoreszenzquenching unterscheidet man zwischen statischer und dynamischer Fluoreszenzauslöschung. Bei der statischen Fluoreszenzauslöschung bildet sich zwischen dem Fluorophor F und dem Quencher Q ein nichtfluoreszierender Komplex FQ. Die Quenchkonstante K_{SV}^{st} , die als Stern-Volmer-Konstante bezeichnet wird [129], kann über das Massenwirkungsgesetz

$$K_{SV}^{st} = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1)$$

hergeleitet werden. Vor der Bildung des Quenchkomplexes FQ liegen die Konzentrationen

$$[F]_0 = [F] + [FQ] \quad (2)$$

und $[Q]_0 = [Q] + [FQ] \quad \text{vor.} \quad (3)$

Gleichung (Gl.) 2 in Gl. 1 eingesetzt ergibt dann [129]

$$K_{SV}^{st} = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} \quad (4)$$

bzw. $\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_{SV}^{st} [Q], \quad (5)$

welche die Stern-Volmer-Gleichung [129] für die statische Fluoreszenzauslöschung darstellt. Nach Gleichsetzung der Gl. 2 und Gl. 3 ergibt sich mit Gl. 5

$$\frac{[Q]_0}{[Q]} = 1 + K_{SV}^{st} [Q] = \frac{1}{\Phi_F}, \quad (6)$$

in welcher Φ_F die Quantenausbeute ist. Die Quantenausbeute ist proportional zur Konzentration der Fluorophore. Bei der dynamischen Fluoreszenzauslöschung kollidiert das Fluorophor mit dem Quencher und gibt seine Energie strahlungsfrei ab [130]. Die Herleitung der Stern-Volmer-Gleichung für die dynamische Fluoreszenzauslöschung führt zu [130]

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_{SV}^{dyn} [Q]. \quad (7)$$

Die Auftragung $[F]_0/[F]$ vs. $[Q]$ liefert in beiden Fällen, nämlich bei der statischen und der dynamischen Fluoreszenzauslöschung, einen linearen Zusammenhang, dessen Steigung (A und B in **Abb. 4**) die Stern-Volmer-Konstante darstellt. Die Lebensdauer des angeregten Zustandes ist ohne Kollision (τ_0) größer als mit Kollision (τ). Die Auftragung von τ_0/τ vs. $[Q]$ liefert beim statischen Quenching eine waagerechte Linie bei $\tau_0/\tau = 1$ (C in **Abb. 4**) und beim dynamischen Quenching eine Gerade (D in **Abb. 4**), die mit derjenigen der Auftragung $[F]_0/[F]$ vs. $[Q]$ zusammenfällt. Treten beide Quencheffekte auf, so wird die Steigung der Auftragung $[F]_0/[F]$ vs. $[Q]$ flacher (E in **Abb. 4**), während die Auftragung τ_0/τ vs. $[Q]$ einen nichtlinearen Verlauf einnimmt (F in **Abb. 4**).

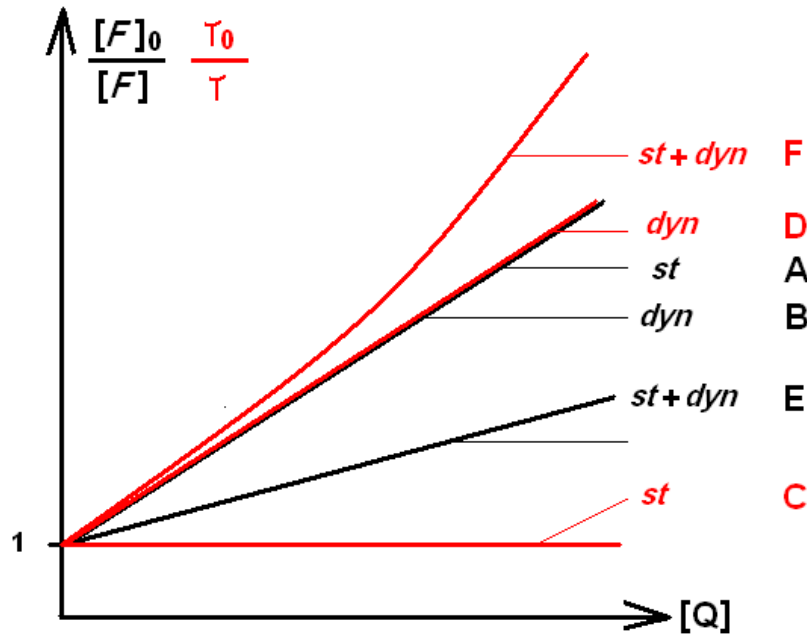


Abb. 4. Stern-Volmer-Auftragungen. Schwarze Auftragungen: $[F]_0/[F]$ vs. $[Q]$. Rote Auftragungen: τ_0/τ vs. $[Q]$. **A** und **C**: statisches (st) Quenching. **B** und **D**: dynamisches (dyn) Quenching. **E** und **F**: statisches und dynamisches Quenching. (Modifizierte Abbildung aus [129,130].)

Wie in **Kap. 2.3** berichtet, stehen angeregten Molekülen mehrere Möglichkeiten offen, strahlungslos ihre aufgenommene Energie abzugeben, z. B. über Internal Conversion (IC) oder Intersystem Crossing (ISC). Eine weitere Möglichkeit der Energieabgabe ist die Fluoreszenz-auslöschung (Quenching) durch Stöße. Beim Quenching treten die Fluorophore in Wechselwirkung mit ihren Nachbarn [131]. Das kann aber auch zu einem Fluoreszenzanstieg führen. Bei der Anregung gehen die Elektronen vom Singulettgrundzustand meistens in den ersten, seltener in höhere angeregte Singulettzustände über [131]. Über Interkombination oder Intersystem Crossing gelangen die Elektronen strahlungslos in den ersten Triplettzustand, dessen direkter Zugang aus dem Grundzustand verboten ist. Dort verbleiben die Elektronen deutlich länger als im ersten angeregten Singulettzustand. Dieses Szenario betrifft eine bestimmte Population der angeregten Fluorophore. Aus diesem Grunde wird nur die Fluoreszenz, die aus dem Rückspringen der Elektronen in den Grundzustand resultiert, gemessen. Die Elektronen im Triplettzustand kehren erst nach längerer Zeit in den Grundzustand unter Abstrahlung von Phosphoreszenzlicht zurück. Während sich das Elektron im ersten Triplettzustand aufhält, kann es durch Kollision mit Triplettquenchern, wie z. B. dem im Normalzustand vorliegenden Triplettsauerstoff, Energie abgeben, so daß das Fluorophor in seinen Grundzustand zurückkehrt [132] und einem neuen Fluoreszenzzyklus zur Verfügung steht. Das dem Sauerstoff übertragene Elektron, das sich jetzt im ersten Triplettzustand

befindet, steht nun für einen künftigen Fluoreszenzzyklus zur Verfügung. Dies führt letzten Endes zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

Ein weiteres Phänomen stellt das Selfquenching (Selbstausslöschung) dar [133], bei dem der Quenchvorgang mit gleichartigen Molekülen erfolgt [134]. Häufig tritt es bei einer hohen Fluorophorendichte auf [135]. Aber auch Prozesse wie Proteindimerisation [136] oder Proteinfaltung [137] können zu einem Selfquenching führen.

2.4 Totalreflexion und evaneszente Welle

Tritt ein Lichtstrahl von einem optischen Medium auf ein anderes mit einem verschiedenen Brechungsindex, so wird dieser in ihm gebrochen. Dabei fand Snellius, daß das Verhältnis der Sinus der auf die Einfallsebene bezogenen Brechungswinkel, umgekehrt proportional der Brechungsindizes ist [138,139]. Dieses Verhältnis ist das Gesetz von Snellius

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (8)$$

Aus diesem Brechungsgesetz folgt, daß Licht beim Übergang vom optisch dichteren Medium n_1 zum optisch dünneren Medium n_2 vom Einfallslot, das senkrecht zur Phasengrenze liegt, weggebrochen wird und umgekehrt [140]. Vergrößert man den Einfallswinkel des Lichtes, so wird ein Teil des Lichtes vom Einfallslot weggebrochen und ein anderer reflektiert. Bei noch weiterer Vergrößerung des Einfallswinkels wird kein Licht mehr transmittiert; es breitet sich an der Grenzfläche beider Medien, also im Winkel von 90° in bezug auf das Einfallslot, aus. Diesen Winkel bezeichnet man als den kritischen Winkel θ_{krit} . Bei Einfallswinkeln, die größer als der kritische Winkel sind, erfolgt Totalreflexion. Der kritische Winkel ist über die Gleichung

$$\theta_{krit} = \arcsin \frac{n_2}{n_1} \quad (9)$$

gegeben. Im optisch dichteren Medium bildet sich eine stehende Welle aus, die aus der Interferenz von einfallendem und reflektiertem Licht resultiert. Die Ausbreitung der aus Knoten und Wellenbäuchen bestehenden Welle ist lediglich auf den Interferenzbereich lokalisiert [141]. Das einfallende Licht wird aber nicht an dem Bereich der Grenzfläche reflektiert, an dem es auftrifft, sondern, im Vergleich zur geometrischen Reflexion, seitlich verschoben [142]. Dieser Effekt wird als Goos-Hänchen-Verschiebung bezeichnet und wurde von Goos und Hänchen im Jahre 1943 entdeckt [143]. In das optisch dünnere Medium, im Bereich der Goos-Hänchen-Verschiebung, tritt das elektromagnetische Feld ein, was Goos und

Hänchen mit einem Prisma nachwiesen. Die Eindringtiefe ist abhängig von den Brechungsindizes und der Anregungswellenlänge und hängt über die Gleichung [144]

$$d_p = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{n_1^2 \cdot \sin^2 \theta_{krit} - n_2^2}} \quad (10)$$

zusammen. Aus Gl. 10 ist zu entnehmen, daß mit zunehmender Wellenlänge λ_0 die Eindringtiefe größer wird. Der Index 0 bezeichnet die Wellenlänge des Anregungslichtes (λ_2) im Vakuum. Mit

$$\lambda_0 = n_2 \cdot \lambda_2 \quad (11)$$

folgt für die Eindringtiefe im optisch dünneren Medium 2

$$d_p = \frac{\lambda_2}{2\pi\sqrt{(n_1/n_2)^2 \sin^2 \theta_{krit} - 1}}. \quad (12)$$

Für die Bindungsstudien von rhBMP-2 an Quarzglas und an modifizierten Quarzglasoberflächen, wurde mit $\lambda_2 = 285$ nm, $n_1 = 1,496$, $n_2 = 1,353$ und $\theta_{krit} = 70^\circ$ eine Eindringtiefe von $d_p = 161$ nm berechnet. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Anregungswellenlänge λ_2 als λ_{ex} bezeichnet. **Abb. 5** zeigt eine stehende Welle (A) im optisch dichteren Medium (n_1) und die exponentiell (C) abfallende Grenzflächenamplitude (B) im optisch dünneren Medium (n_2).

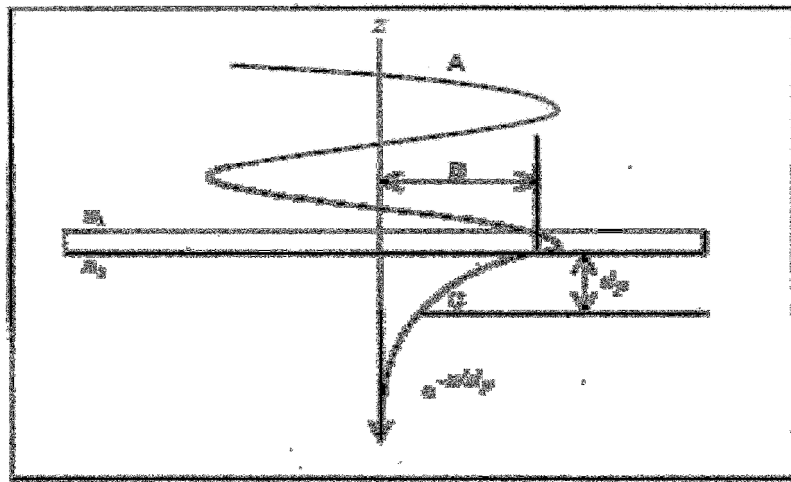


Abb. 5. Darstellung einer evaneszenten Welle. Entstehung einer evaneszenten Welle C mit der Eindringtiefe d_p durch den exponentiellen Abfall der transmittierten Grenzflächenamplitude B im optisch dünneren Medium n_2 . A: stehende Welle im optisch dichteren Medium n_1 . (Abbildung aus [40]).

In [20] ist die elektrische Feldamplitude des senkrecht polarisierten evaneszenten Feldes E_{\perp}^e (B in **Abb. 5**) in Abhängigkeit von der Eindringtiefe d_p am Beispiel des senkrecht polarisierten Lichtes beschrieben und führt dort zur Gleichung [20]

$$E_{\perp}^e = E_{y(0)}^t e^{-z/d_p}. \quad (13)$$

Hierin ist $y(0)$ die Richtung des elektrischen Feldvektors E_{\perp}^t der senkrecht polarisierten elektromagnetischen Welle, deren Feldamplitude in z -Richtung abfällt. Häufig wird der Ausdruck E_{\perp}^e in seiner quadratischen Form verwendet und beschreibt dann die Intensität der evaneszenten Welle, welche mit zunehmender Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes, in der Regel das Anregungslicht, weiter in das optisch dünnere Medium eindringt, wie dies in **Abb. 6** dargestellt ist.

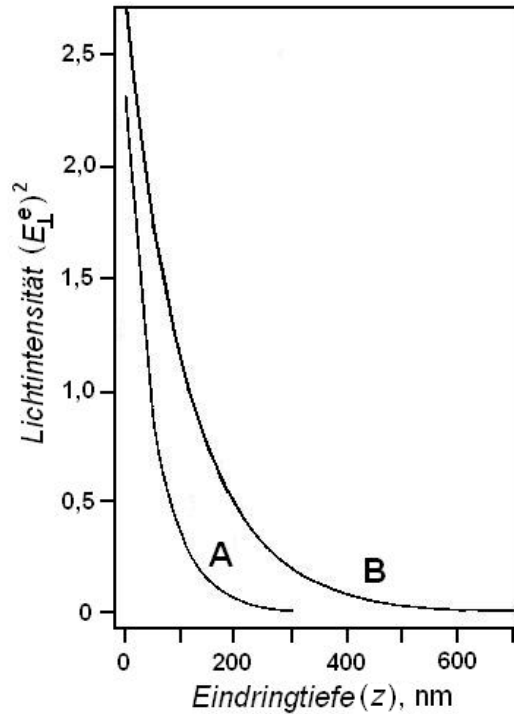


Abb. 6. Exponentielle Abnahme der Lichtintensität mit der Distanz z . $(E_{\perp}^e)^2$: Lichtintensität. **A:** $\lambda_{ex} = 284 \text{ nm}$, $n_1 = 1,496$, $n_2 = 1,353$, $\theta_{krit} = 70^\circ$. **B:** $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $n_1 = 1,467$, $n_2 = 1,333$, $\theta_{krit} = 70^\circ$. (Abbildung aus [20]).

Abb. 6 zeigt die Intensität der evaneszenten Welle, also das Quadrat der elektrischen Feldamplitude $(E_{\perp}^e)^2$, in Abhängigkeit von der Einfallsnormalen z von der Grenzfläche xy für zwei verschiedene Anregungswellenlängen [20]. Bei einer Anregungswelle von 284 nm erfolgt ein schnellerer Abfall der Intensität der evaneszenten Welle als bei 488 nm. Entsprechend ist die Eindringtiefe d_p bei kleineren Wellenlängen geringer. Das Auflösungsvermögen ist bei

kleinen Wellenlängen höher, da infolge geringerer Eindringtiefe der Hauptanteil des Anregungslichtes größtenteils nur die adsorbierten und nicht die gelösten Moleküle erfaßt. Bei größeren Wellenlängen dringt das evaneszente Feld weiter in die Bulkphase ein, so daß mehr gelöste Moleküle von ihm erfaßt werden. Freilich relativiert sich dieser Effekt bei zunehmend geringer werdenden Konzentrationen.

2.5 Verwendung der evaneszenten Welle zur Anregung [20]

Die gemessene Fluoreszenz ist proportional dem Produkt von Absorptions- und Emissionswahrscheinlichkeiten. Da die Absorption der anregenden, evaneszenten Welle proportional zur Molekülkonzentration an der Grenzfläche ist, besteht die Möglichkeit, die Fluoreszenz, die von den adsorbierten Molekülen ausgeht, zu quantifizieren. In der Regel wird die Fluoreszenz eines Moleküls beeinflusst durch das Produkt von $\Phi \cdot f(\lambda_{em}) \cdot a$. Darin ist Φ die Quantenausbeute, $f(\lambda_{em})$ der Anteil der gesamten Strahlung, die bei der Wellenlänge λ_{em} emittiert wird, und a der Anteil der gesamten Strahlung, die bei λ_{em} gemessen wird. Im Falle einer innerhalb der TIRF-Zelle homogen verteilten, fluoreszierenden Substanz ist die Intensität der Fluoreszenz gegeben durch [20]

$$N = 2,303 \cdot \Phi \cdot f(\lambda_{em}) \cdot a \cdot \varepsilon \cdot c \cdot b \int_0^\infty (E_\perp^e)^2 dz, \quad (14)$$

mit ε dem Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge λ_{ex} und c der Konzentration. Der Term $b \int_0^\infty (E_\perp^e)^2 dz$ entspricht dem Produkt der Lichtintensität des einfallenden Lichtes mit der Dicke d der Meßzelle in der konventionellen Spektrofluorometrie. Im Falle, daß das einfallende Licht senkrecht polarisiert ist, folgt mit Gl. 13 [20]

$$\int_0^\infty (E_\perp^e)^2 dz = \int_0^\infty (E_\perp^e \cdot e^{-z/d_p})^2 dz \cdot E_\perp^e = E_{y(0)}^e \cdot e^{-z/d_p}. \quad (15)$$

Adsorbiert ein Stoff an der Grenzfläche, geht Gl. 14, unter Einbezug von Gl. 15, über in [20]

$$N = 2,303 \cdot a \cdot b \int_0^\infty f(\lambda_{em})_{(z)} \cdot \Phi_{(z)} \cdot \varepsilon_{(z)} \cdot c_{(z)} \cdot (E_{y(0)}^e \cdot e^{-z/d_p})^2 dz. \quad (16)$$

Hierin sind $f(\lambda_{em})$, Φ , ε und c abhängig vom Abstand z von der Grenzfläche. Für verdünnte Lösungen ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional der Intensität des anregenden evaneszenten Feldes [145] und den Wahrscheinlichkeiten von Absorption und Emission, solange kein Streulicht vorliegt. Zur Quantifizierung der adsorbierten Moleküle müssen die Fluoreszenz N_a der adsorbierten Proteinmoleküle, die nach Ausspülen der Probelösung mit

Puffer direkt gemessen werden kann, und der evaneszente Anteil der Fluoreszenz N_b^e der gelösten Proteinmoleküle, die aus der Bulkphasenfluoreszenz der Proteinlösung berechnet werden muß, verwendet werden. Beide Fluoreszenzen resultieren aus der Anregung durch das evaneszente Feld (siehe **Kap. 2.6**). Das Verhältnis der Fluoreszenz des absorbierten Proteins (Index a) zu der Fluoreszenz des Proteins in der Bulkphase (Index b) ist gegeben durch [20]

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{2,303 \cdot a \cdot b \int_0^\Delta f(\lambda_{em})_{(z)} \cdot \Phi_{a(z)} \cdot \varepsilon_{(z)} \cdot c_{(z)} \cdot (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}{2,303 \cdot a \cdot b \int_\Delta^\infty f(\lambda_{em})_{(z)} \cdot \Phi_{b(z)} \cdot \varepsilon_{(z)} \cdot c_{(z)} \cdot (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}. \quad (17)$$

Liegt die adsorbierte Proteinschicht mit der Volumenkonzentration Γ_{vol} im Bereich von $0 < z < \Delta$ und die Bulkphase mit der Proteinkonzentration c_p im Bereich von $\Delta < z < (d - \Delta)$, so kann Gl. 17 vereinfacht werden zu [20]

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{\Phi_a}{\Phi_b} \cdot \frac{\Gamma_{vol}}{c_p} \cdot \frac{\int_0^\Delta (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}{\int_\Delta^\infty (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}, \quad (18)$$

wenn die Einschränkung gilt, daß $f(\lambda_{em})$ und ε für die adsorbierten und gelösten Proteinmoleküle gleich sind. Δ ist die Dicke der adsorbierten Proteinschicht und d die Dicke der Meßzelle, bezogen auf die z -Achse. Nimmt man nun an, daß sich die Quantenausbeute der adsorbierten und gelösten Proteinmoleküle nicht ändert und gleich ist, also $\Phi_a / \Phi_b = 1$ ist, so folgt aus Gl. 18 [20]

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{\Gamma_{vol}}{c_p} \cdot \frac{\int_0^\Delta (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}{\int_\Delta^\infty (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}. \quad (19)$$

Diese Annahme ist allerdings nicht gerechtfertigt, wenn die Proteinmoleküle nur eine geringe Anzahl intrinsischer fluorophorer Gruppen besitzen, da in Gegenwart einer Grenzfläche sowohl die Mikroumgebung der fluorophoren Gruppen als auch der Energietransfer von den Tyrosin- zu den Tryptophangruppen in adsorbierten Molekülen beeinflußt werden. Ebenso kann der Grad der Oberflächenbedeckung die Emissionswahrscheinlichkeiten beeinflussen. Bei einer größeren Anzahl intrinsischer Fluorophore in Proteinmolekülen ist davon auszugehen, daß sich der Effekt der Proteinadsorption nur unwesentlich auf das Emissionsverhältnis auswirkt, so daß sich selbiges eins nähert. In diesem Fall ist mit den Parametern N_a und N_b^e die Berechnung von Γ_{vol} und daraus die Berechnung der Oberflächenkonzentration (Beladung) des

adsorbierten Proteins Γ_p möglich, wobei die Dicke Δ der adsorbierten Proteinschicht bekannt sein muß. Γ_p ist nur dann unwesentlich von der Schichtdicke Δ abhängig, solange diese deutlich kleiner als die Anregungswellenlänge λ_{ex} ist. Die gemessene Fluoreszenz setzt sich aus den Fluoreszenzen zusammen, die aus der Anregung durch die evaneszente Welle und aus der Anregung durch das Streulicht folgen. Das gestreute Anregungslicht resultiert zum einen aus dem apparativen Streulicht und zum anderen aus dem durch gelöste Moleküle gestreuten Anregungslichtes. Das Hauptproblem in der Auswertung ist allerdings das apparative Streulicht, das durch ungenaue optische Bauteile, schlecht fokussiertes Anregungslicht und durch die Eigenschaften der Kopplungsflüssigkeit bestimmt wird. Jedes Streulicht, das von Molekülen ausgeht und in der TIRF-Zelle gefunden wird, ist aber vernachlässigbar klein, solange das apparative Streulicht durch Sauberkeit und optimale Justierung der optischen Komponenten weitgehend reduziert wird. Zur Kontrolle des Streulichtes werden üblicherweise nichtadsorbierende Standards wie z. B. Tryptophan oder seine Derivate eingesetzt.

2.6 Berechnung der Oberflächenkonzentration an Grenzflächen bei TIRF-Experimenten [20]

Für die Intensität der gemessenen Fluoreszenz wurde das von Hlady [20] vorgeschlagene Formelzeichen N verwendet. Für die Fluoreszenz werden verschiedene Indizes verwendet. Diese sollen hier kurz erklärt werden.

$*$	in Anwesenheit von adsorbiertem Protein
0	reine Pufferlösung
a	adsorbiertes Protein
b	Proteinlösung
e	evaneszenter Anteil
s	Streulichtanteil
S	Standardlösung
tot	totaler (gesamter) Anteil, also $e + s$

Leitet man eine Lösung eines nichtadsorbierenden Standards durch die TIRF-Meßzelle, so mißt man die Fluoreszenz N_s^{tot} , die nach der Einleitung von Puffer rasch auf die Fluoreszenz N_0 absinkt. N_0 ist die Fluoreszenz, die gemessen wird, wenn in der Meßzelle keine fluoreszierenden Moleküle mehr vorliegen (Grundrauschen). Im Falle einer Proteinlösung wird die Fluoreszenz N_{b*}^{tot} gemessen, siehe **Abb. 7**. Die Verdrängung der Proteinlösung durch Puffer-

lösung (Bufferflush), führt zu einem Absinken der Fluoreszenz nicht auf den Wert null, sondern auf den Wert N_a , da auf der Oberfläche adsorbierte Proteinmoleküle verbleiben. Die Fluoreszenz N_{b*}^{tot} sinkt um die Fluoreszenz N_b^{tot} . Letztere resultiert aus der Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle in der Bulkphase, so daß [20]

$$N_{b*}^{tot} = N_b^{tot} + N_a. \quad (20)$$

folgt. Allerdings findet man das Absinken der Fluoreszenz N_{b*}^{tot} auf den Wert N_a um den Wert N_b^{tot} nur bei genügend hohen Proteinkonzentrationen. Dann nämlich werden so viele gelöste Proteinmoleküle angeregt, daß sich dies als zusätzliche Fluoreszenz bemerkbar machen kann.

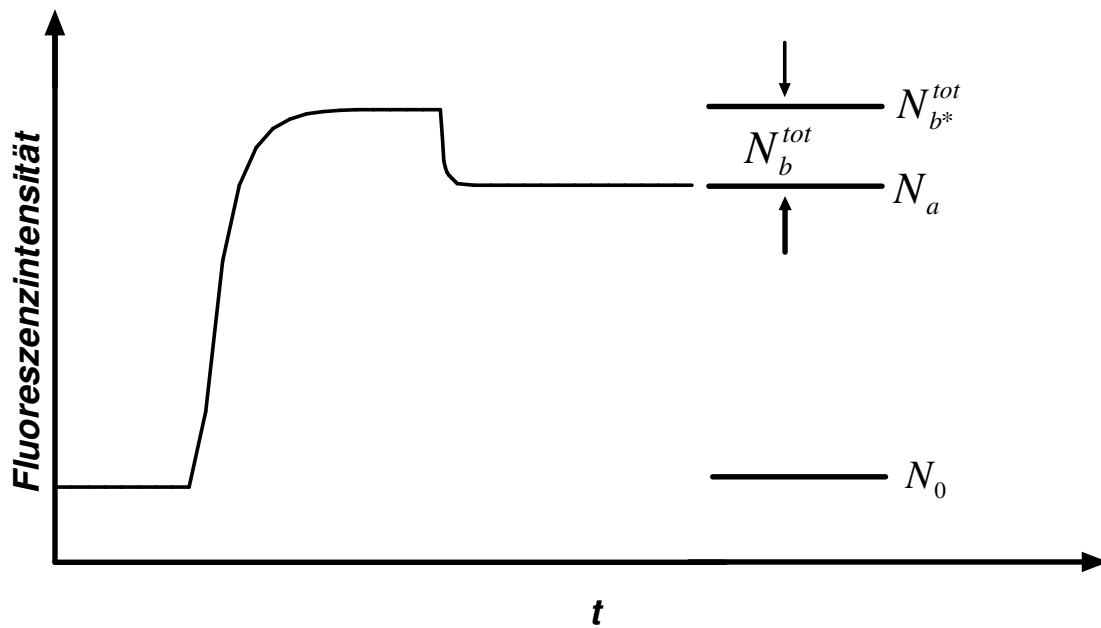


Abb. 7. Schematische Darstellung des Fluoreszenzverlaufs bei einem Bufferflush. Bei hohen Proteinkonzentrationen in der Bulkphase, wird die Fluoreszenz des adsorbierten Proteins N_a und diejenige der Bulkphase N_b^{tot} gemeinsam als Fluoreszenz N_{b*}^{tot} gemessen. Nach dem Auspülen der Bulkphase mit Puffer (Bufferflush) wird nur noch die Fluoreszenz des adsorbierten Proteins N_a gemessen. N_0 ist das Grundrauschen, das vor der Einleitung der Proteinlösung gemessen wird. Von jeder Sorptionskinetik ist N_0 zu subtrahieren. (Abbildung aus [40]).

Die Fluoreszenzintensität des gelösten Proteins in der Bulkphase N_b^{tot} besteht aus dem evaneszenten Anteil N_b^e und dem Streulichtanteil N_b^s . Es gilt somit für die Bulkphase [20]

$$N_b^{tot} = N_b^e + N_b^s. \quad (21)$$

Die Fluoreszenzintensität N_s^{tot} des Standards, der sich ausschließlich in der Bulkphase befindet, da er nicht adsorbiert, setzt sich ebenfalls aus einem evaneszenten Anteil N_s^e und einem Streulichtanteil N_s^s zusammen, so daß

$$N_s^{tot} = N_s^e + N_s^s. \quad (22)$$

gilt. Analog zu den Gl. 21 und 22 ist für die Fluoreszenz des adsorbierten Proteins

$$N_a^{tot} = N_a^e + N_a^s \quad (23)$$

zu formulieren. Die gemessene Fluoreszenz N_a^{tot} setzt sich aus den Teilfluoreszenzen N_a^e und N_a^s zusammen. Die Fluoreszenz N_a^s des adsorbierten Proteins aus der Anregung durch Streulicht ist jedoch gegenüber der gemessenen Fluoreszenz N_a^{tot} nur sehr gering und kann vernachlässigt werden, weil sich die adsorbierten Proteinmoleküle nur in einem kleinen Volumenelement der evaneszenten Region befinden und somit nur von einer zu vernachlässigenden Streulichtmenge erfaßt werden können. Demnach resultiert die Fluoreszenz der adsorbierten Proteinmoleküle nahezu vollständig aus der Anregung durch das evaneszente Feld und wird vereinfacht mit N_a gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit soll die Fluoreszenz der Standardlösung N_s^{tot} , die sich aus dem evaneszenten Fluoreszenzanteil und dem Streulichtanteil zusammensetzt (siehe Gl. 22), als Gesamtfluoreszenz der Standardlösung bezeichnet werden. Analog handelt es sich bei der Fluoreszenz N_b^{tot} um die Gesamtfluoreszenz der Proteinlösung (siehe Gl. 21).

Bei verschiedenen Experimenten ist die Fluoreszenz N_a der adsorbierten Proteinmoleküle (bei Anwendung von Proteinlösungen gleicher Konzentration) nahezu unverändert, während die Gesamtfluoreszenz der Bulkphase N_b^{tot} , auch bei sehr verdünnten Bulkphasen, starken Schwankungen unterliegen kann. Deshalb findet man für die gleichen Versuche häufig variierende Gesamtfluoreszenzen. Ursächlich hierfür ist das Auftreten von apparativem Streulicht und in zu vernachlässigendem Maße Streulicht von gelösten Molekülen. Gestreutes Anregungslicht besitzt im Gegensatz zum evaneszenten Feld eine sich ausbreitende Natur. Dieser Umstand ermöglicht es, die durch einen Bufferflush experimentell ermittelte Gesamtfluoreszenz der Proteinlösung N_b^{tot} um den aus Streulicht resultierenden Anteil der Fluoreszenz N_b^s zu bereinigen. Bei nichtadsorbierenden Standards wird mit zunehmender Konzentration bei gegebener Dicke d der TIRF-Durchflußzelle ein Zustand erreicht, bei dem die Intensität des einfallenden, gestreuten Anregungslichtes im gesamten Volumen der TIRF-Zelle durch Absorption nahezu vollständig abgeschwächt wird. Die Fluoreszenz, die aus der Anregung durch das absorbierte Streulicht folgt, steigt ab einer Extinktion von $\varepsilon \cdot c \cdot d > 2$ nicht mehr an, sondern bleibt konstant, wie dies in **Abb. 8** durch die gepunktete Kurve dargestellt ist. Bei der Untersuchung nichtadsorbierender Standards mit dem TIRF-Aufbau

werden Gesamtfluoreszenzen der Standardlösungen N_S^{tot} beobachtet, die ab einer bestimmten Konzentration linear abhängig von der Extinktion werden, siehe gestrichelte Kurve. Dieser lineare Anteil kann nach $\varepsilon \cdot c = 0$ extrapoliert und an der Ordinate entlang bis in den Ursprung verschoben werden, siehe durchgezogene Gerade. Diese Gerade stellt nun die Fluoreszenz der Standardlösung N_S^e dar, die nur aus der Anregung durch das evaneszente Feld entsteht.

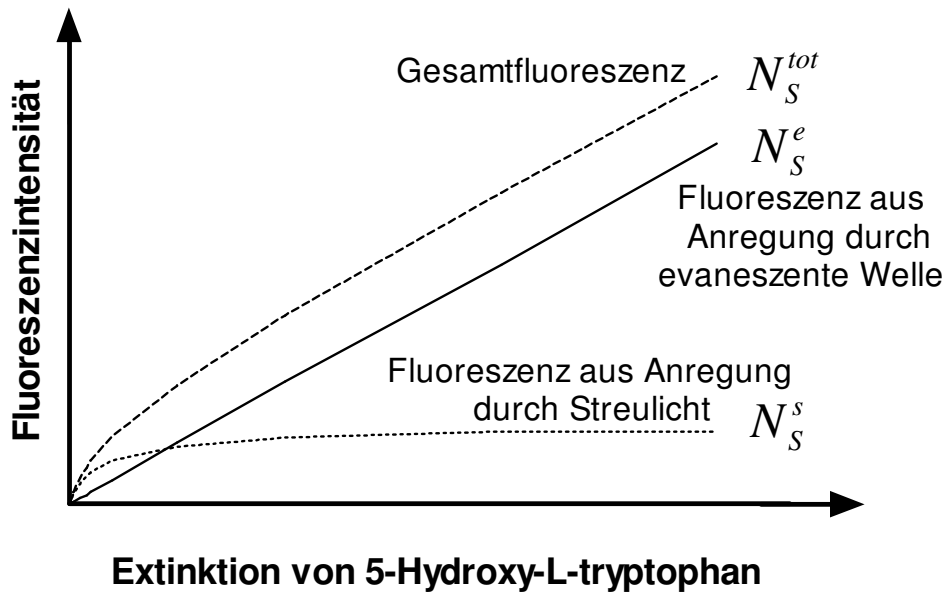


Abb. 8. Schema zur Zusammensetzung der Fluoreszenzbestandteile des in Natriumacetatpuffer ($pH = 4,5$) gelösten Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan in Abhängigkeit von der Extinktion. Die gestrichelte Linie stellt die Gesamtfluoreszenz N_S^{tot} , die durchgezogene Linie den evaneszenten Anteil N_S^e und die gepunktete Linie den Streulichtanteil N_S^s der Fluoreszenz des gelösten Standards dar. (Abbildung aus [40]).

Es ist zu beachten, daß die in **Abb. 8** dargestellten Fluoreszenzen N_S^{tot} und N_S^s nur für denselben Zellaufbau gelten. Bei erneutem Zusammenbau der Meßzelle, können die Fluoreszenzen N_S^s und damit N_S^{tot} teilweise sehr stark variieren, während der evaneszente Anteil der Fluoreszenz N_S^e unverändert bleibt. Sollen Gesamtfluoreszenzen N_S^{tot} von Standards experimentell bestimmt werden, mit dem Ziel, sie in ihre Bestandteile N_S^s und N_S^e zu zerlegen, müssen alle Fluoreszenzmessungen in derselben Meßzelle durchgeführt werden. Wie beim Standard, werden auch Proteinmoleküle bei gleichen fluorophoren Substituenten und gleichem $\varepsilon \cdot c$ die gleiche Menge Anregungslicht vom evaneszenten Feld als auch Streulicht absorbieren. Werden Standard und Protein in derselben Zelle vermessen, so sind bei gleichem $\varepsilon \cdot c$ alle Fluoreszenzanteile gleich, weswegen [20]

$$\frac{N_{b^*}^e}{N_{b^*}^{tot}} = \frac{N_S^e}{N_S^{tot}} \quad (24)$$

geschrieben werden kann. Während das Verhältnis $N_{b^*}^e / N_{b^*}^{tot}$ in Anwesenheit einer adsorbierten Proteinschicht erhalten wird, folgt das Verhältnis N_S^e / N_S^{tot} aus der Anwendung nichtadsorbierender Standards. Aus diesem Grunde ist $N_{b^*}^e$ mit dem Faktor

$$\frac{\int_0^\infty (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}{\int_\Delta^\infty (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz} \quad (25)$$

zu korrigieren [20], so daß Gl. 19 übergeht in

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{\Gamma_{vol}}{c_p} \cdot \frac{\int_0^\Delta (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}{\int_0^\infty (E_{y(0)}^t \cdot e^{-z/d_p})^2 dz}. \quad (26)$$

N_b^e ist die Fluoreszenz der durch das evaneszente Feld angeregten Proteinmoleküle in der Bulkphase mit der Konzentration c_p bei Abwesenheit adsorbierter Proteinmoleküle. Sie ist ein Bestandteil der Gesamtfluoreszenz, welche aus einem Bufferflushexperiment bei hohen Proteinkonzentrationen (Gl. 20) erhalten wird. Entsprechend Gl. 24 gilt ohne Anwesenheit einer adsorbierten Proteinschicht [20]

$$\frac{N_b^e}{N_b^{tot}} = \frac{N_S^e}{N_S^{tot}}, \quad (27)$$

sofern die Extinktionen von Protein- und Standardlösungen gleich sind, also

$$E_S = E_P \quad (28)$$

gilt und die Fluoreszenzen in derselben Meßzelle gemessen werden. Während die Fluoreszenzen aus der Anregung durch Streulicht bei jedem erneuten Zusammenbau variieren, bleiben die Fluoreszenzen aus der Anregung durch das evaneszente Feld gleich. Andrade [20] und später Sanders [146] formulierten eine Gleichung, die nur die evaneszenten Anteile der Fluoreszenzen in den Zusammenhang

$$\left(\frac{N_b^e}{N_S^e} \right)_{(\mathcal{E} \cdot c)'} = \left(\frac{N_b^e}{N_S^e} \right)_{(\mathcal{E} \cdot c)''} = \left(\frac{N_b^e}{N_S^e} \right)_{(\mathcal{E} \cdot c)'''} = \dots \quad (29)$$

brachten. Diese Gleichung besagt, daß für eine beliebige Konzentration einer Proteinlösung und Standardlösung, für die Gl. 28 also $(\mathcal{E} \cdot c)'$, $(\mathcal{E} \cdot c)''$, $(\mathcal{E} \cdot c)''' \dots$ erfüllt ist, die Division von N_b^e durch N_S^e den selben Faktor ergibt, welcher in **Kap. 4.4.1** und **Kap. 4.4.2** als Korrekturfaktor f_K bezeichnet wird. Die Messung der Fluoreszenz von Standards kann für jede Konzentration in derselben Meßzelle durchgeführt werden, da sie nicht adsorbieren. Bei

adsorbierenden Proteinen muß für jedes Adsorptionsexperiment die Zelle erneut gereinigt und wieder zusammengefümmelt werden. Hierbei kann sich die Geometrie der TIRF-Meßzelle ändern, während die Brechungsindizes n_1 und n_2 , die Wellenlänge des Anregungslichtes λ_2 und die Eindringtiefe d_p der evaneszenten Welle unverändert bleiben. In Anwesenheit von adsorbierten Proteinmolekülen wird die Gesamtfluoreszenz N_{b*}^{tot} gemessen, die sich entsprechend der Gl. 20 und 21 aus [20]

$$N_{b*}^{tot} = N_a + N_b^s + N_b^e \quad (30)$$

zusammensetzt. Die Fluoreszenzen N_b^s und N_b^e in der Bulkphase sind gegenüber der Fluoreszenz N_a des adsorbierten Proteins vernachlässigbar klein, so daß [20]

$$N_{b*}^{tot} = N_a \quad (31)$$

formuliert werden darf. Die Gültigkeit dieser Gleichung ergibt sich auch experimentell, da bei Anwendung geringer Proteinkonzentrationen nach Durchführung des Bufferflushs keine Verringerung der Fluoreszenz meßbar ist. Zur Berechnung der Proteinbeladung ist die Fluoreszenz N_b^e notwendig. Für verdünnte Proteinkonzentrationen, bei denen ein Bufferflush nicht zu einem Fluoreszenzabfall führt, müssen die N_b^e -Werte durch Multiplikation der gemessenen Extinktionen mit der Steigung der Geraden aus **Abb. 8** extrapoliert werden. Zur Berechnung der Beladung geht man von Gl. 26 aus, deren Integration [20]

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{\Gamma_{Vol}}{c_P} (1 - e^{-2\Delta/d_p}) \quad (32)$$

liefert. Da das Protein auf der Oberfläche als einlagige Schicht (Monolayer) adsorbiert, ist die Dicke Δ dieser Schicht gegenüber der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes vernachlässigbar gering, so daß für den exponentiellen Term näherungsweise [20]

$$1 - e^{-\frac{2\Delta}{d_p}} \approx \frac{2\Delta}{d_p} \quad (33)$$

niedergeschrieben werden kann. Damit geht die Gl. 32 über in [20]

$$\frac{N_a}{N_b^e} = \frac{\Gamma_{Vol}}{c_P} \frac{2\Delta}{d_p}. \quad (34)$$

Nach Umstellung folgt hieraus [20]

$$\Gamma_{Vol} = \frac{N_a}{N_b^e} \frac{c_P d_p}{2\Delta} \quad (35)$$

und mit $\Gamma_p = \Gamma_{vol} \Delta$ schließlich [20]

$$\Gamma_p = \frac{N_a}{N_b^e} \frac{c_p d_p}{2} \left[\frac{\text{cps}}{\text{cps}} \frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^3} \text{cm} \right] = \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{cm}^2} \right]. \quad (36)$$

Mit Gl. 36 kann die Menge des adsorbierten Proteins auf der Oberfläche (Oberflächenkonzentration) berechnet werden.

2.7 Massentransport

Zur Betrachtung der Kinetiken von Adsorptions- und Desorptionsprozessen müssen die Stofftransportbedingungen beachtet werden. Allgemein erfolgt der Transport von Teilchen über [147]

1. Wärmeübertragung,
2. konduktiven Stofftransport (Diffusion),
3. konvektiven Stofftransport (Strömung) oder
4. einer Kombination aus ihnen.

Durch eine optimale Thermostatisierung bei den Experimenten werden die Temperaturgradienten minimiert, so daß sich der Stofftransport durch Wärmeübertragung forthebt. Für ein Volumenelement, z. B. in einer rechtwinkligen Durchflußzelle, kann die allgemeine Transportgleichung [148]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \left[v_x \frac{\partial c}{\partial x} + v_y \frac{\partial c}{\partial y} + v_z \frac{\partial c}{\partial z} \right] + D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] \quad (37)$$

formuliert werden. Diese Gleichung berücksichtigt die Diffusion D und den konvektiven Stofftransport in die Raumrichtungen x , y und z im Zeitraum dt . v ist die Transportgeschwindigkeit durch Konvektion (Strömungsgeschwindigkeit) in ebendiese Raumrichtungen und c die Teilchenkonzentration in der Lösung. Betrachtet man zunächst zwei unendliche Platten, die sich in x - und z -Richtung aufspannen und eine Lösung, die laminar in x -Richtung durch die yz -Ebene strömt, so fallen die Strömungsterme in y - und z -Richtung fort, da in diese Richtungen keine Konvektion erfolgt. Deswegen geht Gl. 37 über in [149]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -v_x \frac{\partial c}{\partial x} + D \left[\frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right]. \quad (38)$$

Bewegen sich nun Teilchen in y -Richtung durch die xz -Ebene, etwa weil sie adsorbieren, so kann dies nur über Diffusion erfolgen. Die Diffusion in x -Richtung ist gegenüber der Strömung in dieselbe Richtung vernachlässigbar klein und kann vernachlässigt werden. Die Diffusion in

z-Richtung spielt keine Rolle, da nur die Moleküle, die sich in y-Richtung bewegen, beobachtet werden sollen. Aus der vorangehenden Gleichung folgt somit [150]

$$\frac{\partial c}{\partial t} + v_{x(y)} \frac{\partial c}{\partial x} = D \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}. \quad (39)$$

Die Fließgeschwindigkeit $v_{x(y)}$ in x-Richtung ist abhängig vom Abstand y und besitzt ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil (blaue Kurve in **Abb. 13**).^{*} Für eine rechtwinklige Durchflußzelle wurde von Daugherty und Franzini der Zusammenhang [151]

$$v_{x(y)} = \frac{6 \bar{v}_{x(y)}}{b} y \left(1 - \frac{y}{b} \right) \quad (40)$$

mit $\bar{v}_{x(y)}$ der mittleren Fließgeschwindigkeit in x-Richtung und b der Dicke der Durchflußzelle, die deutlich geringer sein muß als ihre Breite w , formuliert. Die Volumenflußrate \dot{V} ist gegeben durch

$$\dot{V} = \bar{v}_{x(y)} \cdot bw. \quad (41)$$

Das Einsetzen der Gl. 41 in Gl. 40 führt zu

$$v_{x(y)} = \frac{6 \cdot \dot{V}}{b^2 \cdot w} y \left(1 - \frac{y}{b} \right). \quad (42)$$

In dieser Gleichung ist [3]

$$\gamma = \frac{6 \cdot \dot{V}}{b^2 \cdot w}, \quad (43)$$

die Scherrate mit welcher Gl. 42 zu [3]

$$v_{x(y)} = \gamma \cdot y \left(1 - \frac{y}{b} \right) \quad (44)$$

vereinfacht werden kann. Gl. 44 in Gl. 39 eingesetzt ergibt [3]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\gamma \cdot y \left(1 - \frac{y}{b} \right) \frac{\partial c}{\partial x} + D \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}. \quad (45)$$

^{*} In **Abb. 13** ist die Abzisse nicht mit y, sondern mit z beschriftet.

Mit den Grenzbedingungen [3]

bei $t = 0$ bei $c = 0$ für alle $y, x > 0$

bei $x = 0$ bei $c = c_0$ für alle $y, t > 0$

bei $y = b/z$ bei $c = 0$ für $t < x/\bar{v}_{x(y)}$

$c = c_0$ für $t \geq x/\bar{v}_{x(y)}$

bei $y = 0$ bei $\partial c / \partial y = 0$ für alle $x > 0, t > 0$

erhielt Lévêque für eine rechtwinklige Durchflußzelle die Gleichung [152]

$$\frac{dn}{dt} = D \frac{c_0}{\delta} = \frac{D \cdot c_0}{\Gamma 4/3 \cdot \sqrt[3]{9}} \sqrt[3]{\frac{6 \cdot \dot{V}}{b^2 w \cdot l D}} \quad (46)$$

mit D dem Diffusionskoeffizienten, c_0 der Konzentration der Bulkphase, δ der Dicke der Diffusionsschicht, Γ der sog. Gammafunktion ($\Gamma 4/3 = 0,2$), l der Länge der Durchflußzelle und γ der Scherrate. Die Lévêque-Gleichung gilt für eine rechtwinklige Zelle im Durchfluß. Liegt keine Strömung vor, so folgt aus Gl. 39 bzw. 45 für den diffusionsabhängigen Fall das 2. Ficksche Gesetz [153]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial y^2}, \quad (47)$$

das die zeitliche Konzentrationsänderung in y -Richtung beschreibt (siehe auch [154]). Ohne Diffusion können die Moleküle nicht die Oberfläche erreichen. Im Falle der Diffusion beschreibt der Konzentrationsverlauf einer Lösung an der Oberfläche einen s-kurvenförmigen Verlauf. Lok, Cheng und Robertson entwickelten die Gleichung [155]

$$\tau = t \cdot \gamma^{2/3} \frac{D^{1/3}}{l^{2/3}} \quad (48)$$

mit welcher sie die dimensionslose Kennzahl $\tau = 3$ ermittelten. Nach der Zeit t wird das Plateau erreicht, daß heißt, in der gesamten Zelle liegt die Konzentration c_0 der eingesetzten Lösung vor. l ist hier die Distanz vom Einspülungsort bis zum Mittelpunkt der Durchflußzelle.

Für die Experimente wurde jedoch eine Kegel-Platte-Durchflußzelle eingesetzt [21,156]. Beim Eintritt der Proteinlösung in die Zelle wird diese schnell durchmischt. Die Durchmischung erfolgt durch einen drehenden Plexiglas[®]-Konus, so daß in der gesamten Zelle eine laminare Strömung und an jedem Ort der xz -Ebene (Zellenboden) die gleiche Scherrate vorliegt [156]. Analog zur rechtwinkligen Zelle ist die Strömungsgeschwindigkeit einer Lösung in der

Zellenmitte (in bezug auf die y -Achse) am größten und verringert sich in Richtung Zellenboden immer weiter, bis sie schließlich zum Erliegen kommt. In der Kegel-Platte-Durchflußzelle ist die Fließgeschwindigkeit die vektorielle Winkelgeschwindigkeit, welche sich aus der Radial- und der Azimutalgeschwindigkeit ergibt [157]. Zur Berechnung der Ankunftszeit t aus Gl. 48 soll für die Kegel-Platte-Durchflußzelle angenommen werden, daß eine rechtwinklige Durchflußzelle vorliegt. Die Strecke vom Einspülort bis zur Zellenmitte (in **Abb. 22** die Strecke zwischen Zulauf und X) beträgt $l = 0,4 \text{ cm}$ und die Scherrate $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Als Diffusionskoeffizient wurde der Wert vom T-Zellenrezeptor D1D2 von $D = 9,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ [42] verwendet, da er eine ähnliche molare Masse wie rhBMP-2 besitzt. Mit $\tau = 3$ ergibt sich aus Gl. 48, daß nach zwei Sekunden in der gesamten Meßzelle die gleiche Konzentration vorliegt.

Üblicherweise verläuft die Adsorption deutlich schneller als die Diffusion der Moleküle zur Oberfläche, weshalb nahe der Oberfläche eine Depletionsschicht entsteht, bei der die Proteinkonzentration geringer ist als in der Bulkphase. Dieser Konzentrationsgradient ist wiederum die Triebkraft für die Diffusion.

2.8 Adsorption, Adsorptionshysterese und Gleichgewichtszustände

Die Adsorption ist die Anreicherung von Stoffen an den Grenzen fester oder flüssiger Körper. Sie ist mit einer Änderung der freien Enthalpie verbunden. Eine Adsorption verläuft spontan, wenn die Änderung der freien Enthalpie negativ ist [158]. Man unterscheidet zwei Arten von Adsorptionen. Während die Chemisorption über eine kovalente Bindung (Elektronentransfer) erfolgt, findet bei der Physisorption kein Übergang von Elektronen statt. Bei der Physisorption ist die Änderung der freien Enthalpie deutlich geringer als bei der Chemisorption. Die Bindung von Proteinen an Oberflächen erfolgt meistens über eine Physisorption. Bei der nichtkovalenten Bindung von Proteinen an Oberflächen wird der Teil der Oberfläche, der vom Proteinmolekül überdeckt wird, als Bindungseinheit bezeichnet [32]. Im Areal der Bindungseinheit (binding unit) befinden sich die Bindungsstellen (binding sites), zwischen denen es zur Wechselwirkung zwischen den Bindungsstellen des Proteins und den Bindungsstellen der Oberfläche kommen kann (nichtkovalente Bindung). Diese Bindungsstellen werden als Haftstellen oder Valenzen [159] bezeichnet. Für die Adsorption eines Proteins an einer Oberfläche kann die Ausbildung mehrerer nichtkovalenter Bindungen erforderlich sein, wie dies z. B. bei der Adsorption von Phosphorylase *b* an Sepharose 4B mit 3 bis 4 Bindungen der Fall ist [5,32]. Die nichtkovalente Bindung kann durch unterschiedliche Wechselwirkungen getragen werden,

die im folgenden aufgeführt sind. Die Angaben der freien Enthalpien gelten für eine Bindungsstelle am Protein.

- Wasserstoffbrückenbindungen mit Bindungsenergien im Bereich von etwa 4 kJ/mol [160].
- Ionische Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen der Oberfläche und geladenen Gruppen eines Proteins mit Bindungsenergien im Bereich von etwa 4 kJ/mol [160].
- Wechselwirkungen nach van der Waals mit Bindungsenergien von etwa 4 kJ/mol [160].
- Charge-Transfer-Wechselwirkungen mit Bindungsenergien von etwa 4 kJ/mol [160].
- Hydrophobe Wechselwirkungen mit Bindungsenergien zwischen 8 bis 11 kJ/mol [160-162]. Sie ist die einzige entropische Wechselwirkung. Durch Aufbrechen der geordneten Wasserstruktur des auf der Substratoberfläche gebundenen Wassers, erfolgt eine Zunahme der Entropie [163].

Während bei der Adsorption das Molekül mit der Oberfläche wechselwirkt, dringt es bei der Absorption vollständig in die andere Phase ein, siehe **Abb. 9** [164].

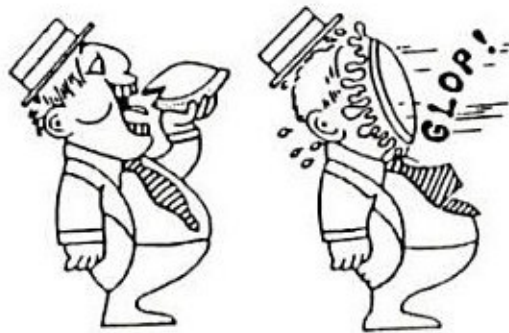


Abb. 9. *Absorption und Adsorption.* Links: Stoff dringt in die Phase ein (Absorption). Rechts: Stoff wechselwirkt mit der Oberfläche (Adsorption). (Abbildung aus [164]).

Die Adsorption setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Zunächst erfolgt die Diffusion des Stoffes bis zur Oberfläche und dann die Physisorption, im Falle der Chemisorption schließt sich die kovalente Bindung an der Oberfläche an. Die Diffusion ist üblicherweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, doch sind auch Reaktionen bekannt, bei denen die Adsorption geschwindigkeitsbestimmend ist [165]. Zumbrink und Jennissen konnten durch Reduktion der Diffusionsschicht diese Transportlimitierung vollständig beseitigen [40-42]. Die darin beschriebene sog. BLEB-Methode (Boundary Layer Exchange by Bubble) [42]) ist die Grundlage dieser Arbeit und wird später behandelt.

Erstmals wurde die Proteinadsorption von Landsteiner und Uhlirz bei der Adsorption von Euglobulinen an Kaolin [166] und später von Starkenstein und Blitz bei Ovalbumin an Eisenoxidgelen [167] untersucht. Vroman fand heraus, daß adsorbierte Plasmaproteine in einer definierten Reihenfolge durch andere ersetzt werden können [168]. Bei der Adsorption von

Proteinen finden Veränderungen der Proteinkonformationen statt, die in mehreren konsekutiven Schritten ablaufen [32,33,169]. Ein Schema für die ersten beiden Konformationsänderungen bei der Adsorption ist in **Abb. 10** dargestellt [22].



Abb. 10. Schema für die ersten beiden Konformationsänderungen bei einer Adsorption. Das gelöste Protein **P** adsorbiert an der Oberfläche **■**. Es kommt zur Ausbildung des Protein-Oberfläche-Komplexes **P^I · ■**, aus dem ein höheraffiner Protein-Oberfläche-Komplex (**P^{II} · ■**) entsteht. **P^I** ist ein Nukleations-Komplex [32] und **P^{II}** eine höheraffine Konformation. k_{+1}° und k_{-1}° bzw. k_{+2}° und k_{-2}° sind die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Konformationsumwandlungen. (Abbildung aus [22]).

Bei der Adsorption bildet das Protein **P** mit der Oberfläche **■** den niederaffinen Protein-Oberfläche-Komplex **P^I · ■**, der sich auf der Oberfläche in den Protein-Oberfläche-Komplex **P^{II} · ■** mit höherer Affinität umwandelt. Bei **P^I** handelt es sich um einen Nukleations-Komplex, welcher nur ein Minimum an Bindungen zur Oberfläche ausbildet [32]. Allmählich wandelt er sich auf der Oberfläche in eine höheraffine Proteinkonformation (**P^{II}**) um. Beide Reaktionsschritte sind über die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1}° und k_{-1}° bzw. k_{+2}° und k_{-2}° miteinander verbunden. Allgemein gilt, daß der zweite Reaktionsschritt viel langsamer abläuft ($k_{+2}^{\circ} < k_{+1}^{\circ}$) [33]. In **Abb. 10** beschreiben die Gleichgewichtspfeile nicht die Bildung des globalen Minimums [22], da eine Adsorptionshysterese vorliegt [32]. Die Hysterese wurde im Jahre 1881 von Ewing entdeckt [170]. Er fand bei der Änderung des äußeren elektrischen Feldes bei einem Magneten, daß seine Reaktion von seiner Magnetisierungsvorgeschichte abhängt [171]. Von von Bemmelen berichtete als erster über eine Adsorptionshysterese, indem er beobachtete, daß der Wassergehalt an Kieselsäure verzögert gegenüber der Änderung des Druckes (Druckminderung) absinkt; nach 2 bis 3 Jahren war der Wassergehalt der Kieselsäure scheinbar auf null abgefallen [172]. Intensiv wurde die Adsorptionshysterese von Gasen an festen Stoffen von Everett untersucht [173]. Everett prägte die moderne Bezeichnung des Begriffes Adsorptionshysterese, nämlich, daß der Rückweg einer Reaktion gegenüber seinem Hinweg verzögert abläuft [173]. Neumann führte dies fast hundert Jahre später auf die Langlebigkeit von metastabilen Zuständen zurück [174]. Jennissen und Botzet berichteten 1979 erstmals über eine Protein-Adsorptions-Hysterese am Beispiel der Adsorption von Phosphorylase *b* an immobilisierten Butylresten auf Agarose unter Angabe thermodynamischer Zustandsfunktionen und

Bindungskonstanten [32]. Im Jahre 1985 erschien ein erster Übersichtsartikel zur Adsorptions-hysterese von Proteinen [175], dem 3 Jahre später ein weiterer folgte [4]. Einige wichtige Aspekte dieser Arbeiten werden folgend kurz referiert. Die in **Abb. 10** dargestellten Proteinkonformationen sind metastabile Proteinkonformationen, deren Gleichgewichte nicht in globalen Minima vorliegen, sondern in sog. Nichtgleichgewichten bzw. apparenten Gleichgewichten [32]. Die in **Abb. 10** dargestellten Gleichgewichtspfeile gelten daher für die Umwandlung metastabiler Proteinkonformationen ineinander. Der thermodynamische Zusammenhang der Gleichgewichte und apparenten Gleichgewichte der korrespondierenden Proteinkonformationen ist in **Abb. 11** dargestellt.

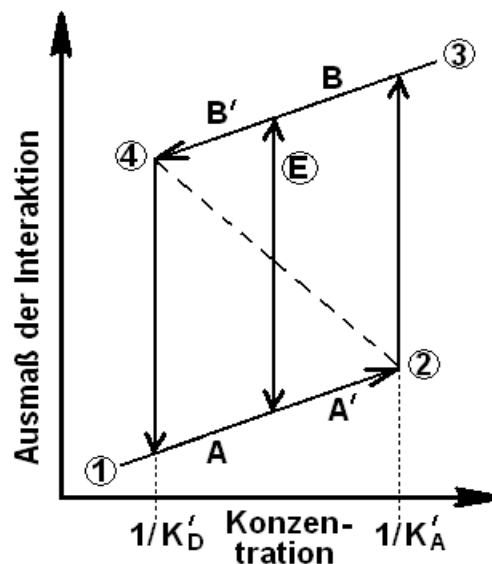


Abb. 11. Schema eines Adsorptions-Desorptions-Zyklus' (Hystereseschleife) eines Proteins an einer Oberfläche. A und B sind stabile, A' und B' metastabile Proteinkomplexe. Adsorption: Schritte 1, 2 und 3. Desorption: Schritte 3, 4 und 1. Adsorption und Desorption verlaufen über irreversible Gleichgewichtszustandsänderungen. Pfeil E steht für eine annähernd reversible Änderung des Gleichgewichtszustandes. K_A und K_D sind Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten (Abbildung aus [175]).

In **Abb. 11** ist ein schematischer Adsorptions-Desorptions-Zyklus (Hystereseschleife) von einem Protein an einer Oberfläche dargestellt. Die Proteinmoleküle in der Lösung befinden sich in einem stabilen Zustand (A). Mit Erhöhung der Proteinkonzentration (Schritte 1 und 2) erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, daß es zur Ausbildung eines metastabilen Nukleations-Komplexes (A') kommt, welcher mit der Oberfläche ein Minimum an Wechselwirkungen eingeht. Im weiteren Verlauf erhöht der metastabile Nukleations-Komplex A' die Anzahl der Bindungen zur Oberfläche (Schritte 2 und 3), wobei es zur Ausbildung des stabilen Nukleations-Komplexes (B) kommt. Im Anschluß erfolgt die Desorption. Hierbei geht der stabile Nukleations-Komplex B zunächst in den metastabilen Komplex B' über (Schritte 3 und

4), der dann als **A** desorbiert (Schritte **4** und **1**). Experimentell ist der direkte Übergang der metastabilen Komplexe **A'** und **B'** ineinander (gestrichelte Linie in **Abb. 11**) nicht zugänglich. Der Pfeil **E** beschreibt einen Gleichgewichtsübergang, der einem reversiblen Übergang der stabilen Konformationen **A** und **B** sehr nahe kommt. Die Übergänge **1** über **2** bis **3** bei der Adsorption und **3** über **4** bis **1** bei der Desorption stellen irreversible Gleichgewichtsübergänge dar. K_A' und K_D' sind Bindungs- bzw. Dissoziationskonstanten.

2.8.1 Adsorptionsisothermen

Die Angabe eines thermodynamischen Adsorptionsgleichgewichtes gilt stets für eine konstante Temperatur (in der vorliegenden Arbeit 23 °C) und wird durch die Adsorptionsisotherme dargestellt. Eine Adsorptionsisotherme beschreibt die Abhängigkeit der Konzentration des Adsorptivs an der Oberfläche (Beladung) von der Konzentration des Adsorptivs in der Lösung im Gleichgewicht [176]. Aus der Adsorptionsisotherme kann für eine gewählte Adsorptivkonzentration in Lösung, die Beladung im Gleichgewicht entnommen werden. Ein Gleichgewicht liegt dann vor, wenn in einem infinitesimalen Zeitraum ebenso viele Proteinmoleküle adsorbieren wie desorbieren. Das Gleichgewicht kann durch viele Größen beeinflusst werden, so etwa durch den *pH*-Wert, der Ionenstärke, der Ladung und der Art der Oberfläche. Im folgenden sollen einige Isothermen vorgestellt werden.

2.8.1.1 Langmuir-Isothermen

Bei der Beobachtung der Adsorption von Gasen an festen Oberflächen stellte Langmuir im Lichte thermodynamischer Betrachtungen einen Zusammenhang zwischen der Gaskonzentration c und der Anzahl der besetzten Bindungsstellen (beachte Definition in **Kap. 2.8**) auf der Oberfläche Γ_C fest, den er mit der Gleichung [177]

$$\Gamma_C = \Gamma_{max} \frac{K_L \cdot c}{1 + K_L \cdot c} \quad (49)$$

beschrieb. Darin ist Γ_{max} die Gesamtzahl der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche und K_L die Gleichgewichtskonstante nach Langmuir, die sich aus der Division der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante durch die Desorptionsgeschwindigkeitskonstante ergibt. Die maximale Oberflächenkonzentration und die Gleichgewichtskonstante können aus der linearisierten Langmuir-Gleichung durch die Auftragung von $1/c$ gegen $1/\Gamma_C$ erhalten werden. Bei der Formulierung von Gl. 49 ging Langmuir von drei Annahmen aus, nämlich [177]

1. daß eine Adsorption reversibel verläuft, so daß sich ein Gleichgewicht einstellen kann,
2. daß jede Bindungsstelle auf der Oberfläche nur ein Molekül zu binden vermag, die Adsorptionseenthalpie an allen Bindungsstellen gleich ist und im Laufe der Adsorption unverändert bleibt und
3. daß zwischen den adsorbierten Molekülen untereinander keine Wechselwirkungen bestehen.

Diese Annahmen führen bei Anwendung von Gl. 49 zu der in **Abb. 12** dargestellten durchgezogenen Isotherme. Bisher konnten keine Langmuir-Isothermen für die Adsorption von Proteinen nachgewiesen werden, da wegen der Adsorptionshysterese keine Gleichgewichtseinstellung erfolgen kann (siehe **Kap. 2.8**). Die Langmuir-Gleichung (Gl. 49) geht bei sehr geringen Konzentrationen über in [177]

$$\Gamma_c = \Gamma_{max} \cdot K_L \cdot c. \quad (50)$$

Unter der Annahme, daß die Anzahl der besetzten Bindungsstellen auf einer Oberfläche gegenüber den unbesetzten Bindungsstellen sehr klein ist, sich also während der Adsorption die Anzahl der unbesetzten Bindungsstellen näherungsweise nicht ändert, folgt aus Gl. 49 die Henry-Gleichung [178]

$$\Gamma_c = K_H \cdot c. \quad (51)$$

Die Anzahl der besetzten Bindungsstellen Γ_c ist dann linear abhängig von der Konzentration des Adsorptivs in der Lösung (nicht abgebildet). K_H ist die Henry-Konstante. Für sehr hohe Adsorptivkonzentrationen geht die Langmuir-Gleichung über in [177]

$$\Gamma_c = \Gamma_{max}. \quad (52)$$

Bei Vorliegen der o. a. Bedingungen, erfolgt die Adsorption bis zur vollständigen Besetzung aller Bindungsstellen auf der Oberfläche, weshalb mit der Langmuir-Isotherme die maximale Oberflächenkonzentration ermittelt werden kann.

2.8.1.2 Freundlich-Isothermen

Allerdings findet man bei Adsorptionen, daß mit zunehmender Oberflächenkonzentration Wechselwirkungen mit den gebundenen Molekülen stattfinden. Dies führt dazu, daß die Oberfläche nicht vollständig besetzt werden kann. Durch empirische Experimente gelang es Freundlich [179], die Gleichung [177]

$$\Gamma_c = a \cdot c^{1/n_F}. \quad (53)$$

aufzustellen. Hierin ist a die Sorptionskonstante und $1/n_F$ der Sorptionsexponent nach Freundlich. Durch Umformung von Gl. 53 in einen doppeltlogarithmischen Ausdruck können die Sorptionskonstante und der Sorptionsexponent erhalten werden. Ist $n_F = 1$, so folgt die Henry-Gleichung (Gl. 51), die im Gleichgewicht eine lineare Abhängigkeit der Beladung von der Konzentration wiedergibt [178]. Bei $n_F < 1$ liegt schon bei niedrigen Konzentrationen eine hohe Anzahl von besetzten Bindungsstellen vor. Ist $n_F > 1$, dann gilt das umgekehrte. Die Freundlich-Isotherme ist in **Abb. 12** durch die gestrichelte Kurve dargestellt. Jennissen fand eine Adsorptionsisotherme nach Freundlich für die Adsorption von Phosphorylase b an Alkylagarose [180].

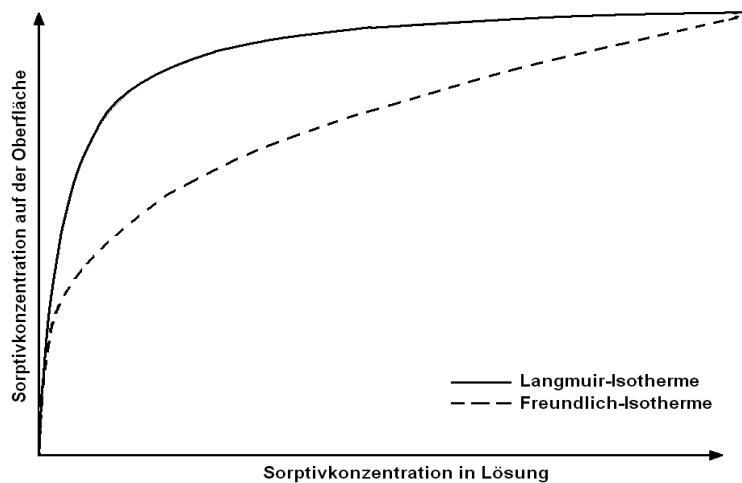


Abb. 12. Adsorptionsisothermen für die Adsorption eines Kohlenwasserstoffes an Silikagel. Durchgezogene Linie: Langmuir-Isotherme ohne kooperative Prozesse. Gestrichelte Linie: Freundlich-Isotherme mit kooperativen Prozessen. (Modifizierte Abbildung aus [181]).

In **Abb. 12** sind zwei Adsorptionsisothermen dargestellt. Die durchgezogene Linie stellt die Langmuir-Isotherme dar, wenn keine kooperativen Prozesse vorliegen. Bei Lösungen mit geringer Konzentration steigt die Oberflächenkonzentration rasch an. Bei Lösungen mit hoher Konzentration ist die Oberflächenkonzentration unabhängig von der Konzentration der Lösung. Bei der Freundlich-Isotherme, gestrichelte Linie in **Abb. 12**, kommen kooperative Prozesse zum tragen. Mit zunehmender Oberflächenkonzentration, stehen immer weniger freie Bindungsstellen zur Verfügung. Aus diesem Grunde wird wegen kooperativer Prozesse (siehe **Kap. 2.8.2**) die Adsorption immer weiter beeinträchtigt, weshalb kein Adsorptionsmaximum erreicht werden kann. Bei sehr geringen Lösungskonzentrationen und Oberflächenkonzentrationen, liegen lineare Abhängigkeiten nach Henry vor (nicht abgebildet).

2.8.1.3 Temkin-Isothermen

Temkin-Isothermen [182] beschreiben Adsorptionsprozesse, bei welchen die Affinität von Proteinen linear [183] mit der Belegung auf der Oberfläche abnimmt. Dieses Phänomen kann durch Repulsionskräfte oder durch Heterogenität an Oberflächen erklärt werden [184] und wird durch Gleichung

$$\Gamma_c = \varphi \ln(\vartheta c) \quad (54)$$

mit φ der Desorptionskonstante und ϑ der Adsorptionskonstante beschrieben. Γ_c und c bedeuten die Anzahl der besetzten Bindungsstellen auf der Oberfläche und die Konzentration der Moleküle in der Lösung.

2.8.1.4 Weitere Isothermen

Verschiedene Isothermen können auch miteinander kombiniert werden, wie z. B. die Langmuir-Freundlich-Isotherme [185], die für große Konzentrationen gegen die maximale Oberflächenkonzentration strebt, allerdings für geringe Konzentrationen nicht die Henry-Gleichung erfüllt. Die Redlich-Peterson-Gleichung führt zu einer Isotherme, die niedrige Konzentrationen gut darstellen kann, aber nicht die Beschreibung im Bereich der maximalen Oberflächenkonzentration erlaubt [186].

2.8.2 Gitterstellen- und Ligandenbindungsfunktionen - Kooperativität bei Adsorptionen

Wie in **Kap. 2.8** dargelegt, wechselwirken bei einer Adsorption Bindungsstellen der Proteine mit den Bindungsstellen der Oberfläche [4,32,159]. Bei hohen Proteinkonzentrationen auf der Oberfläche, wird die Adsorption deshalb zunehmend beeinflusst, wie Freundlich empirisch festgestellt hat [179]. Jennissen führte dies auf Interaktionen zwischen den adsorbierten und adsorbierenden Molekülen zurück [32]. Im Rahmen seiner Untersuchungen setzte er Phosphorylase *b* ein, das er an Alkylreste, die an Sepharose 4B gebunden wurden, adsorbierte. Durch Variation der Alkylrestkonzentration auf der Sepharose bzw. der Proteinkonzentration steuerte Jennissen die Anzahl der Bindungen zwischen Phosphorylase *b* und den Alkylresten [4]. Mit der Gitterstellen- und Ligandenbindungsfunktion [4] können zwei weitere Isothermen dargestellt werden. Für die Gitterstellenbindungsfunktion wird die Konzentration der Proteinlösung konstant gehalten und als Adsorbens betrachtet, während die Anzahl der Bindungsstellen (Alkylreste) auf der Oberfläche verändert wird. Die Oberfläche stellt das Adsorptiv dar. Gewissermaßen adsorbiert die Oberfläche an das Protein. Die Gitterstellenbindungsfunktion ist [4,187]

$$\frac{\Theta_1}{1-\Theta_1} = K_{H_1} (\Gamma_r^S)^{n_{H_1}} \quad (55)$$

mit Θ_1 der fraktionellen Sättigung der Bindungsstellen des Proteins mit den Bindungsstellen der Oberfläche (Alkylreste in [4,187]), K_{H_1} der Hill-Konstanten, Γ_r^S der Sättigungskonzentration der Bindungsstellen (Alkylreste in [4,187]) auf der Oberfläche und n_{H_1} dem Hill-Koeffizienten. Bei $n_{H_1} = 1$ liegt eine monovalente Adsorption vor (eine Bindungsstelle eines Proteins wechselwirkt mit einer Bindungsstelle (Bindungsstelle = Haftstelle oder Valenz [159]) auf der Oberfläche), so daß Gl. 55 übergeht in die Langmuir-Gleichung (Gl. 49). Bei $n_{H_1} > 1$ tritt ein positiv kooperativer Prozeß in Form einer multivalenten Adsorption auf (mehrere Bindungsstellen eines Proteins wechselwirken mit mehreren Bindungsstellen auf der Oberfläche), wobei die Isotherme einen sigmoiden Verlauf annimmt. Bei der Ligandenbindungsfunktion sind die Verhältnisse umgekehrt; die Anzahl der Bindungsstellen (Alkylreste in [4,187]) auf der Oberfläche bleibt konstant und die Konzentration der Proteinlösung wird variiert. Das Protein (jetzt das Adsorptiv) adsorbiert an der Oberfläche (Adsorbens). Für die Ligandenbindungsfunktion gilt [4,187]

$$\frac{\Theta_2}{1-\Theta_2} = K_{H_2} (c_P)^{n_{H_2}} \quad (56)$$

mit Θ_2 der fraktionellen Sättigung, K_{H_2} der Hill-Konstanten, c_P der Konzentration der Proteinlösung und n_{H_2} dem Hill-Koeffizienten. Bei $n_{H_1} = 1$ findet ebenfalls ein Übergang von Gleichung (56) in die Langmuir-Gleichung (Gl. 49) statt, da eine monovalente Adsorption vorliegt. Negativ kooperative Prozesse liegen vor, wenn $n_{H_1} < 1$ ist. Die Adsorptionsisotherme geht dann in eine Isotherme des Freundlich-Typs über. Negativ kooperative Prozesse entstehen durch eine sättigungsbedingte Abnahme der Bindungsstellen (Haftstellen) oder durch intermolekulare Repulsionskräfte der Proteinmoleküle. Bei intermolekularer Anziehung der adsorbierten Proteinmoleküle findet man einen Hill-Koeffizienten von $n_{H_1} > 1$.

2.8.3 Das Corsel-Modell für die Proteinadsorption [13]

Der Transport von Proteinmolekülen zur Oberfläche erfolgt durch Konvektion und Diffusion, siehe Gl. 37. Entsprechend nimmt eine Adsorptionskinetik einen sigmoiden Verlauf ein. Corsel et al [13] stellten für eine transportlimitierte Adsorption eine Gleichung auf, für welche sie im Verlaufe der Adsorption an einer Oberfläche die Annahme machten, daß zwischen den adsorbierten Molekülen untereinander keine Wechselwirkungen stattfinden und die Bindungs-

plätze (Bindungseinheiten) während der gesamten Adsorption unabhängig voneinander sind. Für die Geschwindigkeit der Adsorption formulierten sie die Gleichung

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_{on}(\Gamma_{max} - \Gamma(t))c(0,t) - k_{off}\Gamma(t). \quad (57)$$

Γ_{max} ist die Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht (erhältlich aus der Adsorptionsisotherme), $\Gamma(t)$ die Oberflächenkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit t . k_{on} und k_{off} sind intrinsische Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten. $c(0,t)$ ist die Konzentration der Proteinlösung an der Grenze zur Oberfläche ($x=0$). Die intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten sind abhängig von der sich ändernden Oberflächenkonzentration. Die Abhängigkeit bezeichnet man als negative bzw. positive Kooperativität [4,180]. Für die interaktionsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten gilt [22]

$$k_{on} = k_{+1}e^{-\alpha\Gamma} \text{ und } k_{off} = k_{-1}e^{-\beta\Gamma}. \quad (58)$$

α und β sind Interaktionskonstanten und k_{+1} und k_{-1} sind Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten, die unabhängig von der Oberflächenkonzentration und von Interaktionen sind. Die intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} sind jedoch nicht nur abhängig von der Kooperativität, sondern auch vom Massentransport. Unter der Annahme, daß im System zunächst kein Protein vorliegt und daß dann bei $t=0$ die Proteinkonzentration auf c_b (der Konzentration der eingeleiteten Proteinlösung = Bulkphasenkonzentration) ansteigt, lösten Corsel et al. [13] das 2. Ficksche Gesetz [153], siehe Gl. 47, mit den Randbedingungen

$$D \frac{\partial c(0,t)}{\partial x} = k_{on}(\Gamma_{max} - \Gamma(t))c(0,t) - k_{off}\Gamma(t) = \frac{d\Gamma}{dt} \text{ und} \quad (59)$$

$$c(\delta,t) = c_b \text{ für } x = 0. \quad (60)$$

D ist der Diffusionskoeffizient und δ die dicke der ungerührten Schicht. Die Ortskoordinate x steht senkrecht auf den Zellenboden. In **Kap. 2.7** wurde die Ortskoordinate, die senkrecht auf dem Zellenboden steht, mit dem Buchstaben y gekennzeichnet. c_b , die Konzentration der Bulkphase, wurde in **Kap. 2.7** mit dem Formelzeichen c_0 gekennzeichnet. In der ungerührten Schicht bildet sich ein linearer Konzentrationsgradient aus, aufgrund dessen Gl. 59 in

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = D \frac{\partial c(0,t)}{\partial x} = D \frac{c_b - c(0,t)}{\delta} \text{ oder} \quad (61)$$

$$c(0,t) = c_b - \frac{\delta}{D} \frac{d\Gamma}{dt} \quad (62)$$

umformuliert werden kann. Die in Gl. 57 angegebenen intrinsischen Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} gelten für den Fall, daß keine Transportlimitierung vorliegt. Beim Vorliegen einer Transportlimitierung werden aus ihnen die apparenten Geschwindigkeitskonstanten

$$k_{on}^{app} = k_{on} \frac{D}{D + \delta k_{on} (\Gamma_{max} - \Gamma)} \quad (63)$$

und
$$k_{off}^{app} = k_{off} \frac{D}{D + \delta k_{on} (\Gamma_{max} - \Gamma)}, \quad (64)$$

so daß mit ihnen aus Gl. 57

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_{on}^{app} (\Gamma_{max} - \Gamma(t)) c_b - k_{off}^{app} \Gamma(t) \quad (65)$$

folgt. Jennissen und Zumbrink erreichten durch die Anwendung einer Luftblase bei der Einleitung der Proteinlösung, daß die Nerntsche Diffusionsschicht δ_N von 10 μm [188] auf etwa 200 nm [22,40-42] reduziert wurde, so daß mit $\delta_N \rightarrow 0$ Gl. 63 und Gl. 64 übergehen in [22]

$$k_{on}^{app} = k_{on} \quad (66)$$

und
$$k_{off}^{app} = k_{off}. \quad (67)$$

Damit folgt aus der Differentialgleichung (Gl. 65)

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_{on} (\Gamma_{max} - \Gamma(t)) c_b - k_{off} \Gamma(t). \quad (68)$$

Die Lösung dieser linearen Differentialgleichung über einen exponentiellen Ansatz liefert für die Randbedingung $\Gamma(t=0) = \Gamma_0$ mit Γ_0 der Gleichgewichtsbeladung zum Zeitpunkt $t = 0$

$$\Gamma(t) = \Gamma_0 e^{-(k_{on}c_b + k_{off})t} + \frac{k_{on}\Gamma_{max}c_b}{k_{on}c_b + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on}c_b + k_{off})t}\right) \quad (69)$$

und für die Randbedingung $\Gamma(t=0) = 0$

$$\Gamma(t) = \frac{k_{on}\Gamma_{max}c_b}{k_{on}c_b + k_{off}} \left(1 - e^{-(k_{on}c_b + k_{off})t}\right). \quad (70)$$

Mit
$$\Gamma_0 = \frac{k_{on} \Gamma_{max} c_b}{k_{on} c_b + k_{off}} \quad (71)$$

und
$$k_{obs} = k_{on} c_b + k_{off} \quad (72)$$

vereinfacht sich Gl. 69

zu
$$\Gamma(t) = \Gamma_0 (1 - e^{-tk_{obs}}). \quad (73)$$

Ein Adsorptionsexperiment liefert bei dem verwendeten Versuchsaufbau (TIRF) einen zeitabhängigen Anstieg der Fluoreszenz (Adsorptionskinetik), deren Anstieg der k_{obs} -Wert ist. Da der k_{obs} -Wert abhängig von der Konzentration c_b ist, wird sie in der vorliegenden Arbeit als konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante bezeichnet. Die Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Konzentrationen liefert die interaktionsfreien Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} . Für den verwendeten Versuchsaufbau folgt aus Gl. 73

$$N_a(t) = N_{max} (1 - e^{-tk_{obs}}). \quad (74)$$

N_a ist die gemessene Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit t und N_{max} ist die gemessene Fluoreszenz beim Vorliegen der maximalen Oberflächenkonzentration. Wird für die Desorption eine Lösung mit der Proteinkonzentration $c_b = 0$, also eine Pufferlösung, eingesetzt, geht die Differentialgleichung 68 über in

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = -k_{off} \Gamma(t), \quad (75)$$

deren Lösung

$$\Gamma(t) = \Gamma_{max} e^{-tk_{-1}} + R. \quad (76)$$

ist. Da die Desorption im Vergleich zur Adsorption sehr langsam abläuft, können Behinderungen durch Interaktionen und Transportlimitierung vernachlässigt werden. Unter der Annahme einer Reversibilität bei der Desorption gilt $R = 0$. Damit folgt aus Gl.76

$$\Gamma(t) = \Gamma_{max} e^{-tk_{-1}}. \quad (77)$$

Die Gl. 77 ergibt sich auch über einen kinetischen Ansatz für Reaktionen pseudoerster Ordnung [169,189,190], die zu einer Differentialgleichung führt und deren Lösung einen exponentiellen Ansatz liefert [191].

2.9 Ausbildung und Wirkung einer Nanoschicht

Der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung [192] wird charakterisiert durch die dimensionslose Reynoldszahl [193]. Oberhalb der kritischen Reynoldszahl von $Re = 2300$ geht die laminare Strömung in turbulente Strömung über [194]. Im verwendeten TIRF-Rheometer liegt eine laminare Strömung bei einer Reynoldszahl von $Re = 142$ vor [156]. In **Abb. 13** ist ein Geschwindigkeitsprofil (blaue Linie) für die laminare Strömung in x -Richtung dargestellt. Die Pfeillängen symbolisieren in der Abbildung die Strömungsgeschwindigkeiten $v_{x(z)}$.

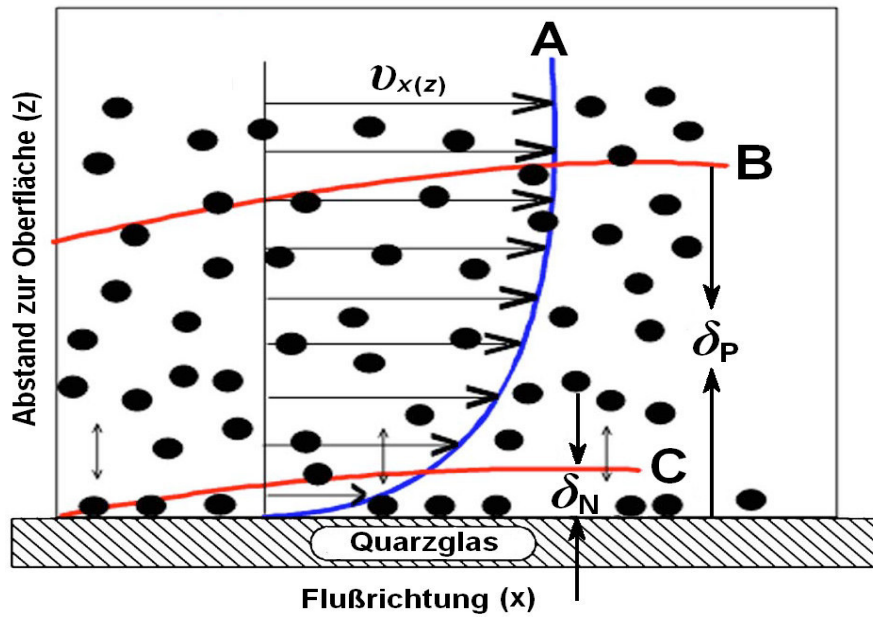


Abb. 13. *Strömungsprofil mit Prandtl- und Nernstscher Schicht. A: Strömungsprofil mit zur Mitte hin wachsenden Strömungsgeschwindigkeiten (blaue Kurve). Kurve B: Prandtelschicht (δ_P) und Kurve C: Nernstsche Diffusionsschicht (δ_N). $v_{x(z)}$: Strömungsgeschwindigkeit (Pfeillängen) in x -Richtung abhängig vom Abstand z zur Oberfläche. Beide Schichten bilden einen laminaren Strom. Punkte zeigen die Proteinmoleküle. (Abbildung aus [42]).*

In **Abb. 13** sind die beiden bekanntesten Strömungsschichten, die hydrodynamische oder Prandtl'sche Grenzschicht [195] und die Nernst'sche Diffusionsschicht [34], abgebildet. Beide Schichten bilden einen laminaren Strom. Die hydrodynamische Grenzschicht (rote Kurve B in **Abb. 13**) erstreckt sich von der Wand bis in den Bereich, in dem sich die Strömungsgeschwindigkeit um 1 % von der Bulkphasenströmungsgeschwindigkeit unterscheidet [42,194]. Sie ist über die Gleichung [42]

$$\delta_P \approx 5 \sqrt{\frac{\nu \cdot x}{v_{x(z)}}} \quad (78)$$

mit ν der kinematischen Viskosität, x der Strömungsrichtung und $v_{x(z)}$ der Strömungsgeschwindigkeit gegeben. Die Nernstsche Diffusionsschicht (Kurve C in **Abb. 13**) ist im allgemeinen 5 bis 50 μm dick [42]. Sie besitzt damit nur etwa 5 % der Dicke der Prandtlschen Grenzschicht [42,194]. Für die Nernstsche Diffusionsschicht gilt mit D dem Diffusionskoeffizienten [156]

$$\delta_N \approx \sqrt[3]{D \cdot \sqrt{\nu} \cdot \sqrt{x/v_{x(z)}}} \quad (79)$$

In einer ruhenden Lösung bewegen sich die Moleküle nur durch die Brownsche Molekularbewegung [196], wobei in jedem Volumenelement die Konzentration der gelösten Moleküle konstant ist. Bei der Adsorption findet in der oberflächennahen Flüssigkeitsschicht eine Konzentrationsverarmung statt, da die Adsorption schneller verläuft als der Konzentrationsausgleich durch Diffusion zwischen der oberflächennahen sog. Depletionsschicht und der Bulkphase. Es entsteht ein Konzentrationsprofil zwischen Depletionsschicht und Bulkphase, daß in seiner Ausdehnung die Nernstsche Diffusionsschicht darstellt. Ändert sich das Konzentrationsprofil im zeitlichen Verlauf nicht mehr, bleibt die Dicke der Nernstischen Diffusionsschicht konstant, so daß näherungsweise ein stationärer Zustand vorliegt. Ein stationärer Zustand kann erreicht werden, wenn z. B. eine geringe Konzentration vorliegt. Dann nämlich steht den gelösten Molekülen eine annähernd unbegrenzte Zahl an Bindungsplätzen auf der Oberfläche zur Verfügung. Im stationären Zustand liegt beim Transport von Molekülen in Richtung Oberfläche ein in Abhängigkeit von der Zeit linearer Konzentrationsgradient vor. Für die linear zeitabhängige Massentransportgeschwindigkeit gilt die Gleichung [22]

$$V_t = \frac{d\Gamma}{dt} = k_{tr} c_b \quad (80)$$

Der Transport zur Oberfläche ist lediglich abhängig von der Massentransportgeschwindigkeitskonstante k_{tr} , die die Dicke der Diffusionsschicht und die Diffusion über die Gleichung

$$k_{tr} = \frac{D}{\delta_N} \quad (81)$$

mit einschließt [22,156]. Die Massentransportgleichung (Gl. 80) entspricht einer Reaktion erster Ordnung, da die Konzentration der Bulkphase c_b wegen des Durchflusses konstant bleibt. Jennissen und Zumbrink [22] beobachteten, daß beim Einleiten einer Proteinlösung mit einer vorangehenden Luftblase in die dort erwähnte Meßzelle, die Transportlimitierung aufgehoben werden konnte.

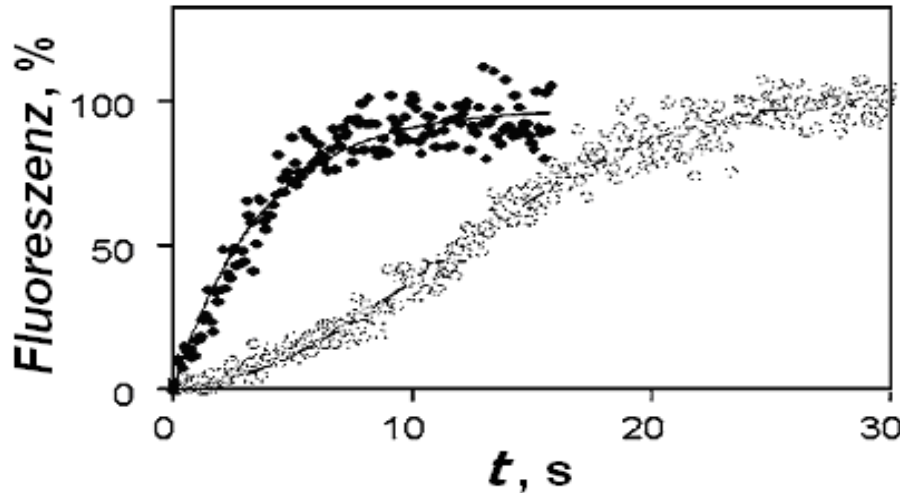


Abb. 14. Adsorptionskinetiken von Fibrinogen ($c = 0,29 \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas bei der Einleitung der Proteinlösung ohne (\circ) und mit (\blacksquare) einer vorangehenden Luftblase in die TIRF-Meßzelle ($V = 120 \mu\text{l}$). Scherrate: $\gamma = 7200 \text{ s}^{-1}$. Die Daten wurden auf 100 % normiert (100 % entspricht einer Fluoreszenz von 2300 cps (ohne) und 2000 cps (mit) Verwendung einer Luftblase ($70 \mu\text{l}$) bei der Einleitung der Proteinlösung. Ohne Luftblase: Massentransportgeschwindigkeit (Gl. 80): $V_t = 0,09 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ ($t_{1/2} = 12,7 \text{ s}$), Adsorptionsgeschwindigkeit: $V_{ads} = 0,4 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$. Mit Luftblase: $V_t = 4,4 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$ ($t_{1/2} = 2,6 \text{ s}$), $V_{ads} = 0,4 \text{ pmol}/(\text{cm}^2 \text{ s})$. (Abbildung und Daten aus [42]).

Wie **Abb. 14** zeigt, führt die Einleitung einer Proteinlösung ohne Luftblase zu einem sigmoiden und damit transportlimitierten Kinetikverlauf, während die Einleitung einer Proteinlösung mit vorausgehender Luftblase zu einer exponentiell verlaufenden Adsorptionskinetik führt. Besonders auffällig ist, daß die Massentransportgeschwindigkeit (Gl. 80) bei der Verwendung einer Luftblase um den Faktor 50 größer ist. Daraus folgt, daß die Luftblase die Nernstsche Diffusionsschicht soweit reduziert, daß ihr Einfluß fortfällt. Die Dicke der verbleibenden Flüssigkeitsschicht nach Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht, konnte mit der TIRF-Rheologie nachgewiesen werden [22]. Es konnte gezeigt werden, daß die Dicke des Flüssigkeitsfilms kleiner ist als die Eindringungstiefe der evaneszenten Welle. Jennissen und Zumbrink fanden eine Flüssigkeitsfilmdicke von etwa 200 nm [22]. Dieses Ergebnis bestätigt den durch die empirische Gleichung von Bretherton [197]

$$h = 0,643r(3Ca)^{2/3}, \quad (82)$$

für eine Filmschichtdicke von etwa 250 nm erhaltenen Wert [156]. Dort berechnete Bretherton näherungsweise die Dicke h des Flüssigkeitsfilms unterhalb der Blase, die sich durch eine Kapillare mit dem Radius r bewegt. Ca ist die Kapillarzahl. Die Luftblase reduziert die Nernstsche Diffusionsschicht auf eine etwa 200 nm dicke sog. Nanoschicht. Die Nanoschicht bleibt nicht nur für die Dauer der Anwesenheit der Luftblase in der Durchflußzelle (3 s)

bestehen; sie bleibt sogar bis zu 60 s, nachdem die Luftblase die Meßzelle verlassen hat, erhalten [22]. Der Austausch der Prandtlschen und Nernstschen Schicht durch die Nanoschicht mittels einer Luftblase wird als BLEB-Methode (boundary-layer exchange by bubble [42]) bezeichnet. Nachdem die Luftblase die Meßzelle verlassen hat, können die Proteinmoleküle von der dann eingeleiteten Lösung ohne Transportlimitierung an der Oberfläche adsorbieren, so daß exponentiell verlaufende Kinetiken resultieren. In **Abb. 15** ist ein hypothetisches Modell zur Ausbildung dieser Nanoschicht dargestellt.

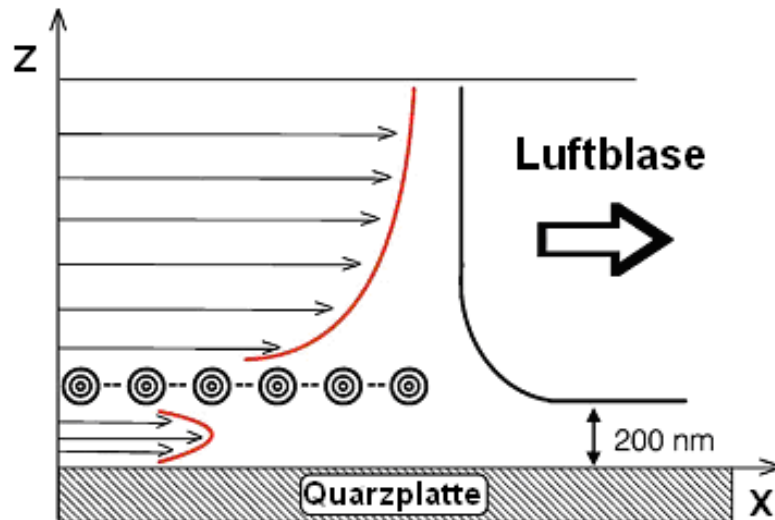


Abb. 15. *Hypothetisches Modell zur Ausbildung einer Nanoschicht.* Dargestellt ist ein Flüssigkeitsstrom in x -Richtung bis zur Mitte (z) zweier paralleler Platten. Nach Einleitung der Luftblase entstehen Wirbel. Sie trennen die Bulkphase (oberhalb der Wirbel) von der Nanoschicht (unterhalb dieser). Die Nanoschicht ist etwa 200 nm dick und hat ca 60 s Bestand [22]. (Abbildung aus [42]).

In der Meßzelle bewirkt die Luftblase die Entstehung einer Nanoschicht auf der Oberfläche, die durch Wirbel von der schnellerfließenden Bulkphase getrennt wird. Da die Bulkphase schneller fließt als die Nanoschicht, führt dies zu einer rückwärtsgewandten Strömung und schließlich zu Verwirbelungen. Durch die Wirbel werden die Proteinmoleküle von der Bulkphase zur Nanoschicht und schließlich zur Oberfläche geführt, so daß sie ohne Transportlimitierung adsorbieren können. Zu den möglichen Grenzen der BLEB-Methode etwa bei Oberflächen mit Randwinkeln von $\theta = 90^\circ$, siehe [42,198-200]. Die Reduktion der transportlimitierenden Prandtlschen und Nernstschen Schicht durch den Einsatz einer Luftblase auf eine bis zu 200 nm dicke Nanoschicht, einhergehend mit der Bildung transportgeschwindigkeitssteigernder Wirbel, führt dazu, daß $\delta_N \rightarrow 0$ wird. Der Übergang von Gl. 63 zu Gl. 66 und von Gl. 64 zu Gl. 67 stellt damit eine zulässige Vereinfachung dar [22,40].

2.10

Randwinkel

Bringt man auf einen festen Körper eine Flüssigkeit, so wird dieser benetzt. Am Rande des aufgetragenen Tropfens findet man einen Dreiphasenpunkt, an welchem Flüssigkeit, Feststoff und Gas in einem bestimmten Winkel zusammentreffen. Der Winkel selbst ist abhängig von den Grenzflächenspannungen der aneinandergrenzenden Phasen. Young veröffentlichte schon vor mehr als 200 Jahren den Zusammenhang [201]

$$\cos \theta = \frac{\sigma_{sg} - \sigma_{sl}}{\sigma_{lg}} \quad (83)$$

mit σ_{sg} , σ_{lg} und σ_{sl} den Grenzflächenspannungen der jeweiligen aneinandergrenzenden Phasengrenzen der festen (s), flüssigen (l) und gasförmigen (g) Stoffe und θ dem Gleichgewichtsrandwinkel. Grenzflächenspannungen werden häufig als Oberflächenspannungen bezeichnet. Die experimentell bestimmbare kritische Oberflächenspannung γ_{krit} [202] beschreibt die Benetzbarkeit von Oberflächen [158]. Der Gleichgewichtsrandwinkel (im weiteren Text als Randwinkel bezeichnet) stellt thermodynamisch ein Gleichgewicht der Grenzflächenspannungen dar [203]. Bei $\theta = 0^\circ$ findet man eine vollständige Benetzung und bei $\theta = 180^\circ$ eine vollständige Nichtbenetzung. Die Young-Gleichung (Gl. 83) gilt allerdings nur für ideale Oberflächen, welche vollkommen glatt sind und weder chemische noch strukturelle Inhomogenitäten aufweisen. Bewegt man einen Tropfen auf einer idealen Oberfläche, so findet man einen Tropfen, der auf beiden Seiten den gleichen Randwinkel aufweist, siehe **Abb. 16 A**. Bei realen Oberflächen deformiert sich der Tropfen, so daß man zwei verschiedene Randwinkel mißt, siehe **Abb. 16 B**.

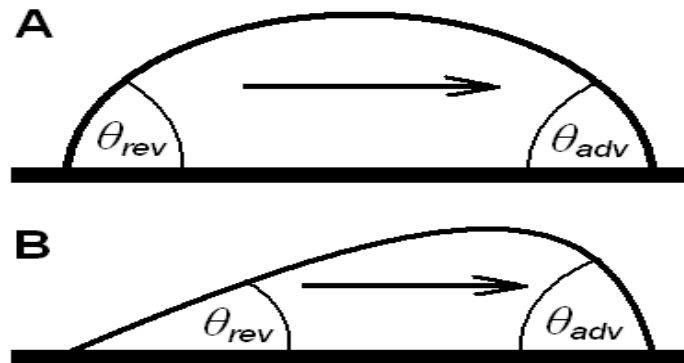


Abb. 16. Entstehung eines Randwinkels. A: Bewegung eines Tropfens auf einer idealen (keine Randwinkelhysterese $\theta_{adv} - \theta_{rev} = 0$) und B: auf einer realen Oberfläche (mit Randwinkelhysterese $\theta_{adv} - \theta_{rev} > 0$). Der Pfeil weist auf die Bewegungsrichtung des Tropfens. θ_{adv} : Vorrückwinkel. θ_{rev} : Rückzugswinkel. (Abbildung aus [203]).

Man unterscheidet zwischen statischen und dynamischen Methoden zur Randwinkelmessung. Bei der statischen Methode wird ein Tropfen auf eine Oberfläche gesetzt (Sessile Drop Methode) und an dem Punkt, an dem alle drei Phasen zusammentreffen, der Randwinkel mittels trigonometrischer Berechnungen oder mit einem Winkelmeßokular ermittelt [204,205]. Jedoch ist die Bestimmung des Randwinkels umso fehlerbehafteter, je kleiner der Randwinkel ist, da das Ansetzen der Tangente nicht exakt möglich ist. Dynamische Methoden stellen eine der aussagekräftigsten Methoden zur Randwinkelmessung dar [206,207]. So wird bei der Ringmethode nach De Noüy die Kraft gemessen, die beim Herausziehen des Ringes aus einer Flüssigkeit unter Überwindung der Oberflächenspannung aufgewendet wird [208,209]. Die meistverwandte Methode ist die dynamische Randwinkelmessung nach Wilhelmy [207,210], welche von Johnson und Dettre derart weiterentwickelt wurde, daß mit ihr Randwinkel an der Dreiphasengrenze bestimmbar sind [211].

Die dynamischen Methoden zur Randwinkelmessung besitzen gegenüber den statischen Methoden den Vorteil, daß Randwinkel bei sich ändernden Gleichgewichtszuständen gemessen werden können. Mit der Wilhelmy-Plate-Methode lassen sich die unterschiedlichen Randwinkel, der Vorrück- θ_{adv} und der Rückzugswinkel θ_{rev} , bestimmen. Im Bereich von Biomaterialien spielen Randwinkel eine entscheidende Rolle. Ursprünglich wurde der Einfluß des Randwinkels zwischen Blut und unterschiedlichen polymeren Biomaterialien untersucht. Daraus leitete Baier ein Modell ab, das eine Korrelation zwischen Biokompatibilität, Bioadhäsion und der kritischen Oberflächenspannung von Festkörperoberflächen gestatten sollte [203,212,213]. Er formulierte für den hydrophoben Bereich der kritischen Oberflächenspannung von $\gamma_{krit} = 20 - 30 \text{ dyn/cm}$ ($\theta_{adv} = 114 - 145^\circ$) den Begriff „hypothetische Zone der Biokompatibilität“, in der die Zelleninteraktionen zur Oberfläche gering sind, weil sich diese nicht aufspreiten. Derzeitig war allerdings die große Rolle der hydrophoben Wechselwirkungen im Rahmen der Adsorption noch nicht allgemein bekannt. Während der Bereich von $\gamma_{krit} = 30 - 40 \text{ dyn/cm}$ von Baier als weder gut für biokompatible Materialien noch als gut für die Verwendung als Substrat für eine biologische Fixierung beschrieben wurde, liegt im hydrophilen Bereich ab $\gamma_{krit} = 42 - 72 \text{ dyn/cm}$ ($\theta_{adv} = 0 - 90^\circ$) eine „Zone guter Bioadhäsion“ vor, welche mit zunehmender kritischer Oberflächenspannung immer besser wird, so daß im ultrahydrophilen Bereich bei $\gamma_{krit} = 68 - 72 \text{ dyn/cm}$ ($\theta_{adv} = 0 - 31^\circ$) eine Zone „starker Bioadhäsion“ vorliegt. Allerdings ist es bis heute noch immer nicht gelungen, eine Biokompatibilität im hydrophoben Bereich von $\gamma_{krit} = 20 - 30 \text{ dyn/cm}$ zu belegen. Im Gegensatz dazu gilt eine gute Gewebe-Bioadhäsion mit Zellspreitung bei hydrophilen Oberflächen als wenig umstritten [214].

In **Abb. 17** sind die Ergebnisse zweier Randwinkelmessungen (Wilhelmy-Plate-Methode) als Abhängigkeit der Masse von der Eintauchtiefe des Probekörpers dargestellt. Die roten Kurven kennzeichnen die Vorrückkurven, die beim Eintauchen des Probekörpers entstehen und die Vorrückwinkel θ_{adv} ergeben. Die grünen Kurven stellen die Rückzugskurven dar, aus welchen die Rückzugswinkel θ_{rev} resultieren.

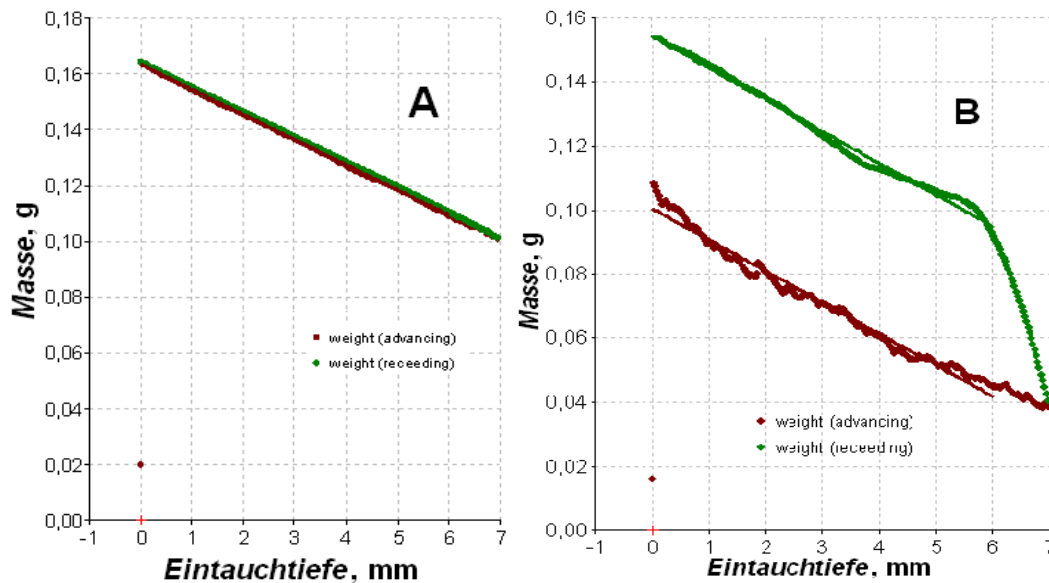


Abb. 17. Vorrück- und Rückzugskurven bei der dynamischen Randwinkelmessung (Wilhelmy-Plate-Methode) von rechteckigen Probekörpern. Rote Kurven: Vorrückkurven. Grüne Kurven: Rückzugskurven. Eintauch- und Zuggeschwindigkeiten sind $16 \mu\text{m/s}$. Eintauchtiefe 7 mm . Eintauchfläche des Körpers: $1 \times 10 \text{ mm}$. **A:** Keine Randwinkelhysterese bei nativem Quarzglas nach Chromschwefelsäurebehandlung und Behandlung mit etwa. 5-proz. ethanol. Kaliumhydroxidlösung (**Kap. 3.3.4.1** und **3.3.4.2**). Vorrück- und Rückzugswinkel: $\theta_{adv} = \theta_{rev} = 0 \pm 0^\circ$. **B:** Starke Randwinkelhysterese bei mit (3-Aminopropyl)-triethoxysilan modifiziertem Quarzglas. Vorrückwinkel: $\theta_{adv} = 52 \pm 2^\circ$, Rückzugswinkel $\theta_{rev} = 19 \pm 2^\circ$.

Treten bei einer dynamischen Randwinkelmessung zwei verschiedene Randwinkel auf, so spricht man von einer Randwinkelhysterese, welche **Abb. 17 B** zeigt. Findet man gleiche Randwinkel, dann liegt keine Randwinkelhysterese vor (**Abb. 17 A**). Andrade unterscheidet zwischen zwei Arten von Randwinkelhysterese [207]. Bei der thermodynamischen Randwinkelhysterese ist die Hystereseurve unabhängig von der Meßzeit und der Anzahl der Meßzyklen im Gegensatz zur kinetischen Randwinkelhysterese. Da in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Randwinkel nur die dynamische Wilhelmy-Plate-Methode eingesetzt wurde, soll sie genauer erläutert werden. Der Prüfkörper ist an einer Feinwaage angebracht. Durch Heben des Flüssigkeitsreservoirs bzw. durch Absenken des Probekörpers taucht der Prüfkörper allmählich in die Flüssigkeit ein, wodurch an der Feinwaage eine Masseänderung gemessen wird. Auf diesen Körper wirkt die Gewichtskraft

$$F_G = m_K \cdot g \quad (84)$$

mit der Masse m_K des Körpers und der mittleren Erdbeschleunigung von $g = 9,81 \text{ m/s}^2$. Berührt er, es sei ein rechtwinkliger, benetzbarer Körper angenommen, mit seiner Grundfläche eine Flüssigkeit, so findet eine Benetzung statt. Diese Benetzung macht sich durch die Zunahme einer Kraft F_B bemerkbar. Die Benetzungskraft F_B resultiert aus der Masse m_l der den Körper benetzenden Flüssigkeit, auf welche ebenfalls die Erdbeschleunigung wirkt. Es gilt

$$F_B = m_l \cdot g . \quad (85)$$

Taucht der Körper weiter in die Flüssigkeit ein, so wirkt die Auftriebskraft F_A der Flüssigkeit der Gewichtskraft und der Benetzungskraft entgegen. Mit der resultierenden Kraftdifferenz

$$\Delta F = F_G + F_B - F_A \quad (86)$$

steht der rechnerische Zugang des Randwinkels über die Gleichung [7,80,213]

$$\cos \theta = \frac{\Delta F}{U \cdot \gamma_l} \quad (87)$$

frei, so denn die Oberflächenspannung γ_l der Flüssigkeit bei gegebener Temperatur und der Umfang U der eintauchenden Probefläche bekannt sind. Ist der Körper, wie oben angenommen nicht rechteckig, sondern, wie die in den Sorptionsstudien verwendeten Quarzglasplatten, rund, so findet man Vorrück- und Rückzugskurven, wie in **Abb. 18** dargestellt, siehe auch [40].

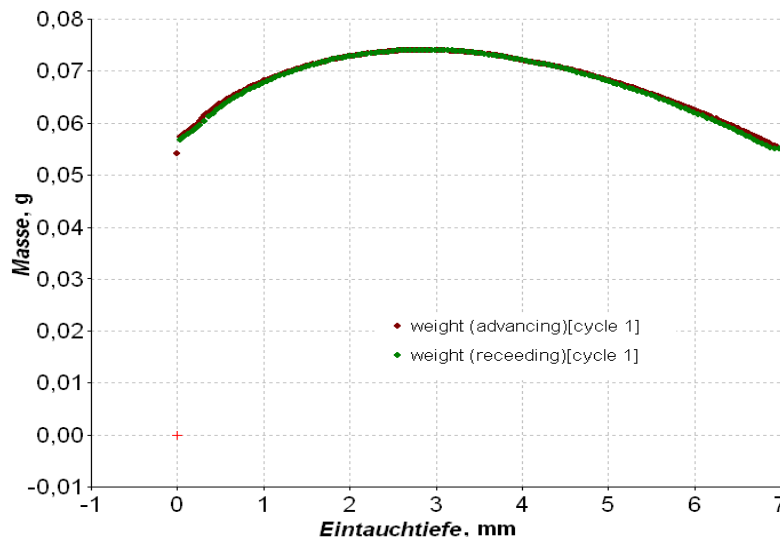


Abb. 18. Vorrück- und Rückzugskurven bei der dynamischen Randwinkelmessung von runden Probekörpern aus nativem Quarzglas. Die Vorrückkurve ist rot und die Rückzugskurve ist grün dargestellt. Es liegt keine Randwinkelhysteresis vor. Vorrück- und Rückzugswinkel können nicht angegeben werden (siehe nachfolgenden Text). Die erste gemessene Masse betrug $m = 0,054 \text{ g}$. Zur Behandlung der Quarzglasplatten und Versuchsbedingungen, siehe **Abb. 17**.

Abb. 18 zeigt die Vorrück- und Rückzugskurven nach Vermessung einer runden Quarzglasplatte. Beide Kurven liegen übereinander, so daß keine Randwinkelhysterese vorliegt. Vorrück- und Rückzugswinkel konnten jedoch nicht berechnet werden. Beim Kontakt mit dem Wasser (Eintauchtiefe 0 mm) erfolgte ein sprunghafter Massenanstieg auf $m = 0,054 \text{ g}$. Aus Gl. 87 wird ersichtlich, daß für den Umfang der eintauchenden Fläche während der gesamten Randwinkelmessung nach der Wilhelmy-Plate-Methode $U > 0$ gelten muß. Bei runden Platten ist der die Eintauchfläche umschließende Umfang zu Beginn null und verändert sich in Abhängigkeit von der Meßzeit.

3 Material, Geräte und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Die für die Experimente verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Hinter der Stoffbezeichnung wurden die Artikelnummern (Art.-Nr.) ohne Füllzeichen, wie etwa Mengenangabe, aufgeführt. In Klammern sind Firma und Sitz der Firma gesetzt. Reinheitsangaben wurden nicht angegeben, weil sie sich aus der Artikelnummer erschließen.

Aceton, Art.-Nr. 20065470 (Prolabo, 64295 Darmstadt), Albumin, Art.-Nr. A1391 (AppliChem, 64291 Darmstadt), (3-Aminopropyl)-triethoxysilan, Art.-Nr. 44,014-0 (Aldrich, 82024 Taufkirchen bei München), Chloroform, Art.-Nr. A1585 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Chromschwefelsäure, Art.-Nr. 2499 (Merck, 64289 Darmstadt), Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Art.-Nr. A1938 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Dinatriumtartrat-Dihydrat, Art.-Nr. 6663 (Merck, 64289 Darmstadt), Dodecylsulfat Natriumsalz, Art.-Nr. A2572 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Ethanol, Art.-Nr. 20821.321 (VWR, 64295 Darmstadt), Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Art.-Nr. 9001 (Merck, 64289 Darmstadt), Glycerin, Art.-Nr. 49769 (Fluka, 89555 Steinheim), HEPES, Art.-Nr. A3724 (AppliChem, 64291 Darmstadt), n-Hexan, Art.-Nr. A1620 (AppliChem, 64291 Darmstadt), 5-Hydroxy-L-tryptophan, Art.-Nr. H9772 (Sigma, 82024 Taufkirchen bei München), Kaliumchlorid, Art.-Nr. A1039 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Kaliumdihydrogenphosphat, Art.-Nr. A1043 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Kaliumhydroxid, Art.-Nr. 6751.3 (Roth, 76185 Karlsruhe), Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, Art.-Nr. 2790 (Merck, 64289 Darmstadt), Methanol, Art.-Nr. 7909.1 (Roth, 76185 Karlsruhe), Natriumacetat-Trihydrat, Art.-Nr. A3628 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Natriumcarbonat (wasserfrei), Art.-Nr. A3900 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Natriumchlorid, Art.-Nr. A1149 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Natriumhydroxid, Art.-Nr. 28244.364 (VWR, 64295 Darmstadt), Poly-DL-laktid Resomer 207 S, Art.-Nr. 63851 (Boehringer-Ingelheim, 55216

Ingelheim am Rhein), Poly-L-glutaminsäure Natriumsalz, Art.-Nr. P4886 (Sigma, 82024 Taufkirchen bei München), Poly-L-lysin Hydrobromid, Art.-Nr. P0879 (Sigma, 82024 Taufkirchen bei München), Salzsäure, Art.-Nr. A3724 (AppliChem, 64291 Darmstadt), D(+)-Sucrose, Art.-Nr. A2211 (AppliChem, 64291 Darmstadt), Toluol, Art.-Nr. 24,451-1 (Aldrich, 82024 Taufkirchen bei München), Trichlorhexylsilan, Art.-Nr. AB111186 (abcr, 76187 Karlsruhe) und Trinatriumcitrat-Dihydrat, Art.-Nr. 6432 (Merck, 64289 Darmstadt).

Das Protein rhBMP-2 wurde hergestellt nach [80]. Für alle Belange wurde vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) verwendet, das über ein Polysulfonfilter vorfiltriert und nacheinander durch zwei Ionenaustauscher geleitet wurde. Nach einer anschließenden UV-Lichtbehandlung wurde das Wasser erneut filtriert, um gegebenenfalls Hefen und Schimmelpilze zu beseitigen. Nach der Behandlung hatte das Wasser einen Gesamtkohlenstoffgehalt von weniger als 5 ppb und eine Leitfähigkeit von höchstens 0,06 μS .

3.2 Geräte

Für die TIRF-Spektroskopie wurde ein Spex Fluorolog Spektrometer Model F112 (Fa. Jobin Yvon Spex, Grasbrunn) mit einer Xenonlampe Typ 450 W/2 (Fa. Osram, München) als Lichtquelle verwendet. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde ein wassergekühlter Photomultiplier (Fa. Products for Research Inc., Danvers Massachusetts, USA) verwendet. Die Quarzglasplatten (Fa. Heraeus, Hanau), bestehend aus Suprasil 1, werden eingehender in **Kap. 3.3.1** und **Kap. 3.3.4** beschrieben. Das Prisma (Fa. Steeg und Reuter, Gießen) besitzt die Maße 26,5 x 20,5 x 9,25 x 10 mm und besteht ebenfalls aus Quarzglas Suprasil 1. Der Plexiglas[®]-Konus (Günter Schäfer Kunststofftechnik GmbH, Offenburg Legersweier) besitzt einen Winkel von 1°. Eine weitergehende Beschreibung der verwendeten Materialien findet sich in den Arbeiten von Jennissen, Sanders und Zumbrink [21,22,156,215].

3.3 Methoden

3.3.1 Das TIRF-Rheometer

Die gesamte Apparatur, als Schema in **Abb. 19** dargestellt, ist auf einem verwindungsfesten Tisch montiert. Die Xenonlampe (X) erzeugt Licht mit einem breiten Spektrum von hoher Intensität. Das Licht wird mittels eines Linsensystems stark fokussiert und durch die 4 mm Blende (B1) in den Excitationsmonochromator geführt, in welchem das UV-Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ herausgefiltert und weiter fokussiert wird. Es verläßt den Excitationsmonochromator durch eine 4,0 mm Blende (B2) und anschließend durch eine 1,0 mm Blende (B3). Das Licht wird durch die Linse (L1) fokussiert und über den Umlenkspiegel (S1) zur

fokussierenden Linse (L2) geleitet. Das fokussierte Licht wird durch das Prisma (P) mit den Abmessungen 26,5 x 20,5 x 9,25 x 10 mm, das sich unterhalb der TIRF-Zelle (T) befindet, gelenkt. Die TIRF-Zelle ist im Rheometer eingebaut (siehe **Abb. 20**). Unter dem kritischen Winkel von 70° trifft das Licht auf die Phasengrenzfläche Quarzglasplatte-Bulkphase, an der es Moleküle zur Fluoreszenz anregt (siehe **Abb. 21**). Der Teil der Fluoreszenzstrahlung, der senkrecht nach unten abstrahlt, wird mit dem Umlenkspiegel (S2), der unterhalb des Prismas in einem 45° -Winkel angeordnet ist, aufgefangen und durch die Linse (L3) geführt um es erneut zu fokussieren. Von dort wird das Fluoreszenzlicht über den Spiegel (S3) umgelenkt und mit der Linse (L3) fokussiert. Über die 4 mm Blende (B4) gelangt es in den Doppelemissionsmonochromator, das das Fluoreszenzlicht der Wellenlänge $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$ herausfiltert und weiter fokussiert. Das fokussierte Fluoreszenzlicht verläßt den Monochromator durch die 4 mm Blende (B5) und gelangt in den mit Wasser gekühlten Photomultiplier (PM), in welchem die Photonen (Einheit: counts per seconds, cps [20]) gemessen und in elektrische Signale umgewandelt werden, so daß am Monitor der Kinetikverlauf verfolgt werden kann.

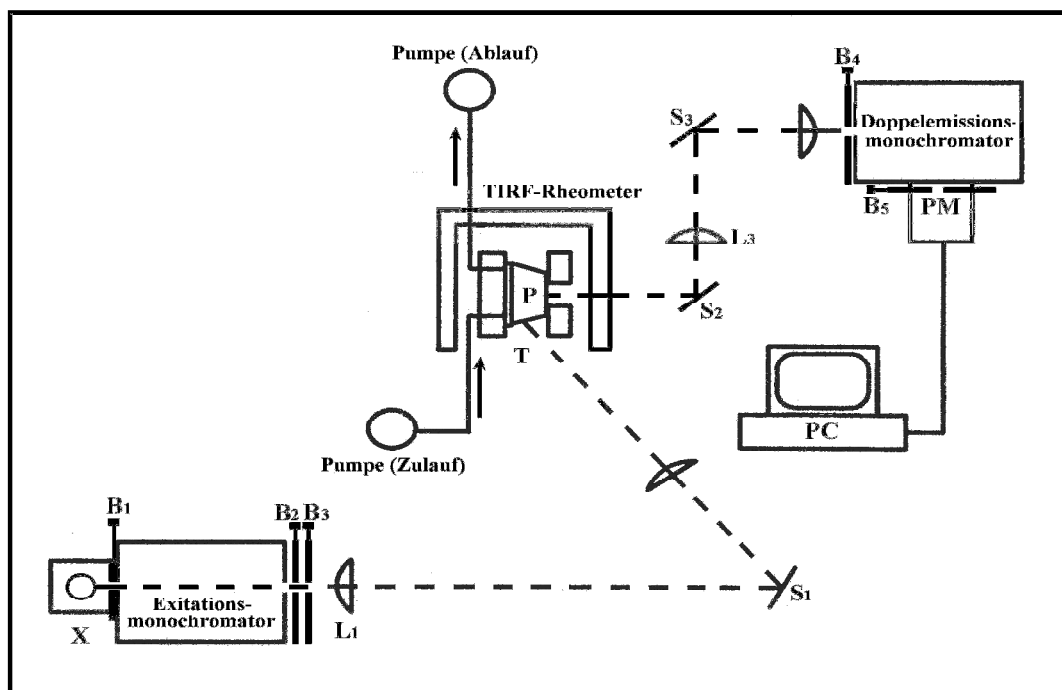


Abb. 19. Schematischer Aufbau zur Durchführung der TIRF-Spektroskopie im Durchflußrheometer. X: Lichtquelle (Xenonbirne). T: Durchflußrheometer mit eingebauter TIRF-Zelle (T) und Prisma (P). PM: mit Wasser gekühlter Photomultiplier. PC: Computer für die Datenaufnahme und -bearbeitung. B1 bis B5: Blenden. L1 bis L4: Linsen. S1 bis S3: Umlenkspiegel. Mit dem Excitations- und dem Doppelemissionsmonochromator wird die erforderliche Wellenlänge des Anregungs- und Fluoreszenzlichtes herausgefiltert. Die Strahlengänge des Anregungslichtes (bis zum Prisma) und die gemessene Fluoreszenzstrahlung (ab dem Prisma) sind gestrichelt dargestellt. (Modifizierte Abbildung aus [146]).

Die Zu- und Ableitung der Lösungen erfolgt durch Peristaltikpumpen. Da die Durchflußzelle konstruktionsbedingt nicht dicht sein kann, muß die Volumenflußrate beim Austrag der Lösung größer angesetzt werden als bei der Einleitung. Die Einleitung der Lösung in die Meßzelle erfolgt mit einer Volumenflußrate von $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$ und der Austrag mit einer Volumenflußrate von $\dot{V} = 228 \text{ ml/h}$. Der Durchfluß verläuft dadurch saugend. Das Durchflußrheometer, siehe **Abb. 20**, besteht aus zwei übereinanderliegenden Edelstahlingen. In den unteren Ring (E) ist die Quarzglasplatte (B) mit dem Prisma (C) eingebaut. Der Plexiglas®-Konus (A) wird in den oberen Ring (nicht abgebildet) eingesetzt. Der obere Ring ist ein Bestandteil des Präzisionskugellagers (G), das wiederum in einem Aluminiumblock (F) fixiert ist. Der obere Ring ist frei drehbar und wird durch einen Keilriemen, der sich im Block (I) befindet, angetrieben. Durch ein externes Steuerelement (nicht abgebildet) ist die Drehzahl des oberen Ringes und damit des eingebauten Konus' regulierbar. Mit einer Mikrometerschraube (H) kann der obere Ring höhenverstellt werden. Der untere Ring befindet sich im Halter (J), der nach unten heruntergezogen werden kann. Die Rheometerhalterung (K) ist auf Gleitschienen montiert, die in der Ebene mit zwei weiteren Mikrometerschrauben justiert werden können.

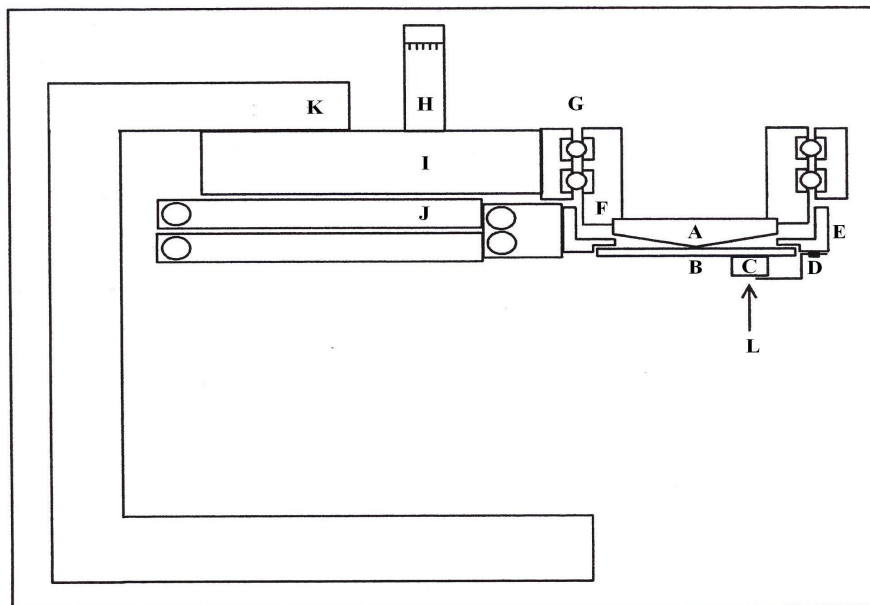


Abb. 20. Schematische Darstellung des Durchflußrheometers. A: Plexiglas®-Konus. B: Quarzglasplatte. C: Prisma aus Quarzglas. D: Haltebügel. E: Edelstahleinsatz für die Quarzglasplatte (B). F: Aluminiumblock zur Aufnahme des oberen Ringes mitsamt des Konus' (A). G: Präzisionskugellager. H: Mikrometerschraube zur Höheneinstellung. I: Block zur Aufnahme der Steuerelemente. J: Halter für den unteren Edelstahleinsatz (auseinanderklappbar). K: Rheometerhalterung, die in der Ebene mit Mikrometerschrauben verstellbar ist. L: Lichtquelle. Zu- und Ablauf sind nicht eingezeichnet. (Abbildung aus [146]).

Die TIRF-Durchflußzelle (**Abb. 21**) besteht im wesentlichen aus einer Quarzglasplatte (**Abb. 22**) und einem Plexiglas®-Konus mit einem Winkel von einem Grad. Der drehende Konus sorgt dafür, daß an jedem Ort der Quarzglasplatte (B) die gleiche Scherrate vorliegt [216].

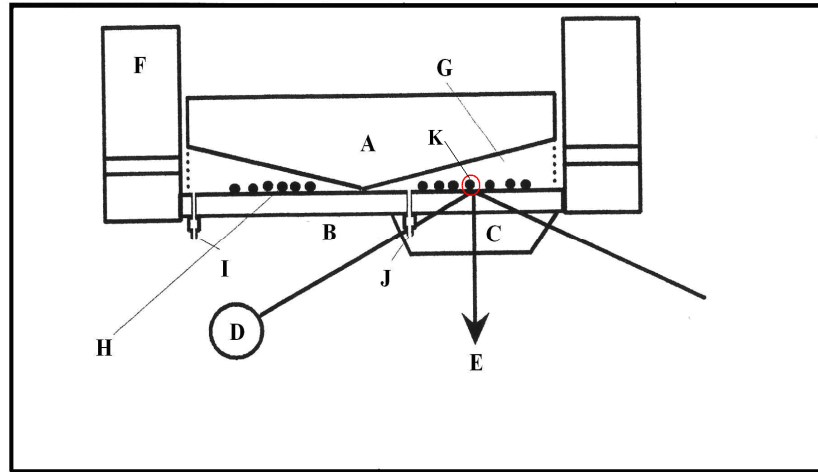


Abb. 21. Vergrößerte Darstellung der TIRF-Meßzelle. A: drehbarer Plexiglas®-Konus. B: Quarzglasplatte. C: Prisma. D: Lichtquelle. E: gemessene Fluoreszenz. F: Metallringe zur Aufnahme der Quarzplatte und des Konus'. G: Bulkphase. H: adsorbierte Proteinmoleküle (schwarze Punkte). J: Plexiglas®-Stützen für Zu- und I: für Ablauf. K: Einflußbereich der evaneszenten Welle (roter Kringel). (Abbildung aus [156]).

In **Abb. 21** ist die verwendete Rheometerdurchflußzelle detaillierter dargestellt. Die Quarzglasplatte (B), die den Zellenboden darstellt, besitzt zwei 1 mm große Durchbohrungen in denen jeweils ein Plexiglas®-Stützen (I und J) eingeklebt ist. Die 5 mm langen Plexiglas®-Stützen besitzen an einer Seite einen Außendurchmesser von 1,0 mm und an der anderen Seite einen Außendurchmesser von 1,2 mm. Der Innendurchmesser beträgt 0,6 mm. An den Stützen sind Zu- und Ableitungsschläuche aus Silikon mit einem Innendurchmesser von 1,15 mm aufgesetzt. Die Zu- und Ableitung der Lösungen erfolgt mit Peristaltikpumpen. Mit Glycerin als Kontaktvermittler ist das Prisma (C) unterhalb der Quarzplatte angebracht und mit zwei Metallbügeln (nicht abgebildet) festgeschraubt. Der drehbare Plexiglas®-Konus (A) befindet sich oberhalb der Quarzglasplatte. Die Proteinlösung (G) wird durch den Stützen (J) eingeleitet und verläßt die Durchflußzelle durch den Stützen (I). Die Proteinmoleküle (H) adsorbieren auf der Quarzglasoberfläche bzw. auf der modifizierten Quarzglasoberfläche (B) und werden durch UV-Licht (D) zur Fluoreszenz angeregt. Die Intensität des Anteils der emittierten Fluoreszenz, die senkrecht (E) zur Adsorptionsebene (B) abstrahlt, wird gemessen. Quarzglasplatte und Konus sind jeweils in einen Edelstahlring eingesetzt, beide Ringe (F) umschließen das von der Bulkphase durchflossene Zellenvolumen ($V \approx 120\mu\text{l}$).

Die Quarzglasplatte, bestehend aus dem Quarztyp Suprasil 1, bzw. die modifizierte Quarzglasplatte bilden das Substrat für die adsorbierenden Proteinmoleküle (H). **Abb. 22** zeigt die Abmessungen der verwendeten Quarzglasplatten. Das gepunktete Rechteck deutet auf das Quarzglasprisma hin, das unterhalb der Quarzglasplatte angebracht ist. Zwischen Prisma und Platte befindet sich als optischer Kontaktvermittler wasserfreies Glycerin. Das verwendete Quarzglas und Glycerin besitzen nahezu identische Brechungsindizes. In beide Bohrungen wird jeweils ein Plexiglas®-Stutzen gesetzt. Die Quarzglasplatte besitzt einen Durchmesser von 36 mm und eine Dicke von 1,0 mm. Der violette Streifen (X) in **Abb. 22** symbolisiert den Einflußbereich (K in **Abb. 21**) der evaneszenten Welle, die zum Betrachter (bzw. in das dünnere Medium) weist. Sie ist maßstabsgetreu in bezug auf das Prisma eingezeichnet. In der verwendeten Versuchsanordnung beträgt die Fläche des Einflußbereiches der evaneszenten Welle etwa 10 mm^2 . Aus diesem Grunde ist diese Meßmethode hochsensitiv.

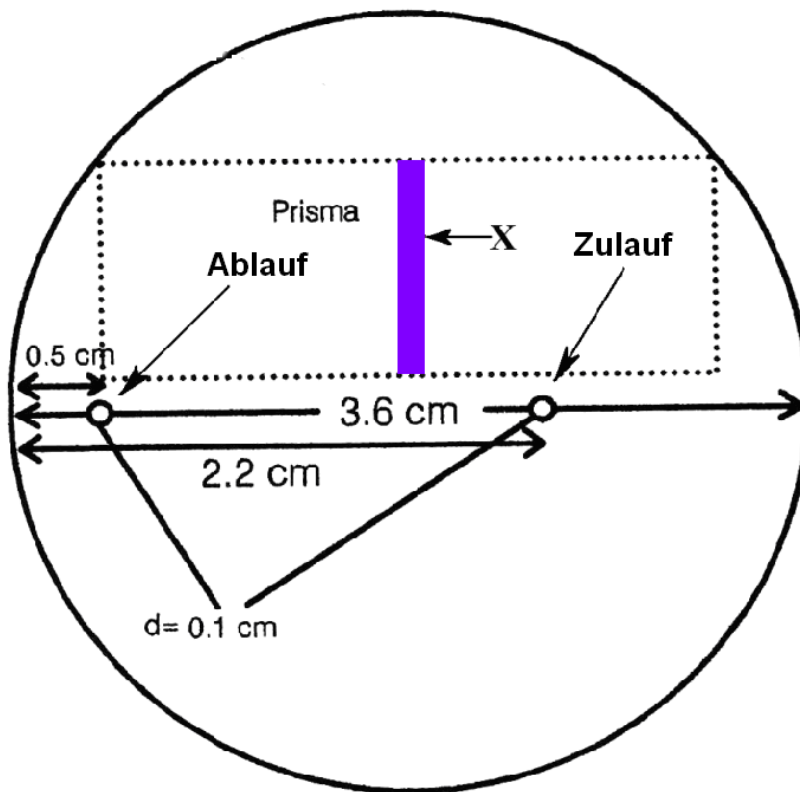


Abb. 22. Maße der Quarzglasplatten in der TIRF-Meßzelle. Der Durchmesser beträgt 36,0 mm und die Dicke 1,0 mm. Das gestrichelte Rechteck stellt das Prisma dar, das sich unterhalb der Quarzglasplatte befindet. Der sich entgegen dem Uhrzeigersinn drehende Konus befindet sich oberhalb der Quarzglasplatte (nicht abgebildet) X: Bereich der von der evaneszenten Welle erfaßt wird. (Modifizierte Abbildung aus [40].)

3.3.2 Reinigung der Meßzelle

Die Komponenten der Meßzelle (siehe **Abb. 21**) bestehen aus unterschiedlichen Materialien und werden daher unterschiedlich gereinigt. Die Metallringe (F in **Abb. 21**) und der Plexiglas®-Konus (A in **Abb. 21**) werden etwa 10 Minuten in Natriumdodecylsulfatlösung (SDS) (1% SDS in 1 M NaOH) eingelegt und danach gründlich mit Milliporewasser und Ethanol abgespült und unter einer horizontal ausströmenden Flowbench (Firma Gelairé® Flowlaboratories, 20090 Opera, Italien) getrocknet. Die runde Quarzglasplatte und das Quarzglasprisma (B und C in **Abb. 21**) werden entsprechend **Kap. 3.3.4.1** gereinigt.

3.3.3 Herstellung der Pufferlösungen

NaAc Natriumacetatpuffer (20 mM, $pH = 4,5$)

2,72 g Natriumacetat Trihydrat werden in knapp einem Liter Milliporewasser gelöst, mit Salzsäure auf $pH = 4,5$ eingestellt und auf einen Liter mit Milliporewasser aufgefüllt.

PBS Phosphatpuffer (8 mM, $pH = 7,4$)

0,201 g Kaliumchlorid, 8,00 g Natriumchlorid, 0,272 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1,248 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat werden in knapp einem Liter Milliporewasser gelöst, mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf $pH = 7,4$ eingestellt und auf einen Liter mit Milliporewasser aufgefüllt.

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer (25 mM, $pH = 7,4$)

5,96 g HEPES und 8,00 g Natriumchlorid werden in knapp einem Liter Milliporewasser gelöst, mit Natronlauge auf $pH = 7,4$ eingestellt und auf einen Liter mit Milliporewasser aufgefüllt.

3.3.4 Reinigung und Funktionalisierung der Quarzglasplatten

Für die Untersuchungen am TIRF-Rheometer werden Quarzglasplatten mit den Abmessungen verwendet, wie sie in **Abb. 22** angegeben sind. Zur Untersuchung der Randwinkel werden rechtwinklige Quarzglasplatten mit den Abmessungen 20 x 10 x 1,0 mm eingesetzt. Die Desorptionsexperimente von radioaktiv markiertem rhBMP-2 wurden an Quarzglasplatten mit den Abmessungen 10 x 5 x 1 mm durchgeführt. Die Behandlung der unterschiedlichen Quarzglasplatten erfolgt in gleicher Weise und ist in den folgenden Kapiteln beschrieben. In **Tab. 3** sind die in den folgenden Kapiteln abgehandelten Oberflächen schematisch dargestellt. Der Einbau der (modifizierten) Quarzglasplatten und der Zusammenbau der Meßzelle erfolgt grundsätzlich unter der Flowbench.

3.3.4.1 Reinigung der Quarzglasplatten mit Chromschwefelsäure [80]

Die Quarzglasplatten (**Kap. 3.3.4**) werden zunächst grob mit Aceton gereinigt, dann mit Aceton und anschließend mit Ethanol mit einem Zellstofftuch abgerieben. Die derart vorgereinigten Platten werden in einen Teflonständer [40] gesetzt. In das Reinigungsgefäß werden etwa 100 ml Chromschwefelsäure (CSS) vorgelegt und der Teflonständer mit den Quarzglasplatten hineingestellt. Unter Rühren wird eine Stunde lang auf 90 °C erhitzt. Nach der Behandlung werden die Quarzglasplatten mit Milliporewasser abgespült. Die so behandelten Quarzglasplatten werden im weiteren Verlauf der Arbeit als native bzw. unmodifizierte Quarzglasplatten bezeichnet. Die gereinigten Quarzglasplatten können mindestens eine Woche in 8 mM PBS ($pH = 7,4$) gelagert werden. Für den direkten Einsatz sind die Platten gründlich mehrmals mit Milliporewasser und dann mit wasserfreiem Methanol abzuspielen und unter der Flowbench zu trocknen.

3.3.4.2 Behandlung der Quarzglasplatten mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung [217]

In ein Reaktionsgefäß, in dem etwa 100 ml einer 5-proz. ethanolischen Kaliumhydroxidlösung (KOH) vorgelegt wurden, wird der Teflonständer mitsamt den Quarzglasplatten (**Kap. 3.3.4**) gesetzt und für eine Stunde unter Rühren auf 80 °C erhitzt. Danach werden die Quarzglasplatten mit Milliporewasser, dann mit 1 M Salzsäure und schließlich erneut mit Milliporewasser gründlich abgespült. Die behandelten Quarzglasplatten können wenigstens eine Woche in 8 mM PBS-Puffer ($pH = 7,4$) gelagert werden. Vor ihrer Verwendung sind die Quarzglasplatten gründlich zunächst mit Milliporewasser und dann mit wasserfreiem Methanol abzuspielen und unter der Flowbench zu trocknen. Es werden nur die Quarzglasplatten mit KOH-Lösung behandelt, an denen keine Funktionalisierung vorgenommen werden soll.

3.3.4.3 Behandlung der Quarzglasplatten mit (3-Aminopropyl)-triethoxysilan und mit Trichlorhexylsilan [95]

In 100 ml trockenem Toluol werden in einer Glovebox (Stickstoffstrom) 5 ml (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APS) aufgelöst. Die Quarzglasplatten (**Kap. 3.3.4**) werden in einem Teflonständer, in die Reaktionslösung gegeben und vier Stunden unter Rühren unter Rückfluß erhitzt. Im Anschluß werden die Quarzglasplatten jeweils dreimal mit Chloroform, Aceton und schließlich mit wasserfreiem Methanol gewaschen. Die so präparierten Quarzglasplatten können etwa zwei Wochen in wasserfreiem Methanol gelagert werden. In gleicher Weise erfolgt die Behandlung mit Trichlorhexylsilan (THS), wobei die Lagerung in n-Hexan für wenigstens zwei Wochen möglich ist.

3.3.4.4 Beschichtung der Quarzglasplatten mit Poly-DL-laktid durch Spincoating [218]

Die Beschichtung der Quarzglasplatten erfolgte in Zusammenarbeit mit T. Sänger durch Inkubation in einer Poly-DL-laktidlosung ($c = 30 \text{ mg/ml}$ PDLLA in Chloroform). Die runde Quarzglasplatte (**Abb. 22**) wird auf eine Drehscheibe gelegt. Vier sie umgebende Stifte, die auf der Drehscheibe fest verankert sind, fixieren die Quarzplatte. Auf die Quarzglasplatte werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig 4 ml Inkubationslösung gegeben, so daß sie gänzlich benetzt wird. Hiernach wird die Platte für 10 s auf eine Drehzahl von 5000 bis 6000 Upm gehalten. Durch die Rotation wird die Inkubationslösung sofort von der Platte geschleudert, was zum Erhalt einer sehr dünnen PDLLA-Schicht führt. Die Quarzglasplatten wurden direkt eingesetzt. Die Spülung der runden Quarzglasplatten erfolgt erst im eingebauten Zustand in der Meßzelle mit NaAc-Puffer ($pH = 4,5$). Die beschichteten Quarzglasplatten können für drei Tage im Kühlschrank bei etwa $4 \text{ }^\circ\text{C}$ trocken gelagert werden. Da die rechtwinkligen Quarzglasplatten nicht auf der Drehscheibe fixiert werden können, erfolgt ihre Beschichtung mit PDLLA durch einmaliges Eintauchen in die PDLLA-Lösung für eine Sekunde.

3.3.4.5 Aufbau von wechselnden Schichten aus Polyglutamat und Poly-L-lysin [219]

Der Aufbau der Schichten erfolgte in Zusammenarbeit mit S. Madenci. Es wird jeweils eine Lösung von Natriumpolyglutamat (PGA) und Poly-L-lysin Hydrobromid (PLL) mit einer Konzentration von $c = 1,0 \text{ mg/ml}$ in 25 mM HEPES-Puffer ($pH = 7.4$) hergestellt. Die gereinigte Quarzglasplatte wird zunächst für 15 Minuten in PGA-Lösung inkubiert und anschließend mit HEPES-Puffer gewaschen. Danach erfolgt in gleicher Weise der Aufbau der PLL-Schicht. Im Wechsel werden die Inkubationen mit den PGA- und PLL-Lösungen durchgeführt, bis 20 Monolagen vorliegen. Die derart behandelten Quarzglasplatten werden am selben Tag eingesetzt (eine längere Halbarkeit wurde nicht geprüft).

3.3.5 Analytische Methoden

3.3.5.1 Randwinkelmessungen

Die Oberflächen der nativen (**Kap. 3.3.4.1** und **3.3.4.2**) und modifizierten Quarzglasplatten (**Kap. 3.3.4.3** und **3.3.4.4**) werden über Randwinkel charakterisiert. Die Randwinkelmessungen erfolgen nach der Wilhelmy-Plate-Methode mit dem Gerät DCAT 11 EC Tensiometer (Dataphysics GmbH, Filderstadt) [220]. Da mit dem vorgenannten Randwinkelmegerat keine runden Platten vermessen werden können (**Abb. 18**), müssen rechtwinklige Quarzglasplatten des Typs Suprasil I mit den Maßen $20 \times 10 \times 1 \text{ mm}$ (L x B x D) eingesetzt werden (**Kap. 3.3.4**). Die Reinigung und Modifizierung der Quarzglasplatten erfolgt in gleicher

Weise wie bei den runden Platten. Für die Randwinkelmessungen werden die Meßkammer und das benötigte Milliporewasser auf 20 °C temperiert. Vor jeder Randwinkelmessung ist der Wasserbehälter dreimal mit Milliporewasser zu spülen. Dann wird er mit Milliporewasser bis fast zum Rand befüllt. Die Quarzglasplatten werden in wasserfreiem Methanol geschwenkt, unter der Flowbench getrocknet und in die Halteklammer eingesetzt. Das Einsetzen der Quarzplatte in die Halteklammer erfolgt in der Weise, daß sich die Eintauchfläche (Breite x Dicke = 10 x 1 mm) parallel zum Wasser befindet, damit sie nicht schräg in das Wasser eintauchen kann. Zur Messung des Vorrückwinkels wird der Wasserbehälter mit einer Geschwindigkeit von 16 µm pro Sekunde angehoben bis das Plättchen 7 mm in das Milliporewasser eintaucht. Anschließend erfolgt die Messung des Rückzugswinkels bei Absenkung des Wasserbehälters mit gleicher Geschwindigkeit. Je Sekunde werden 10 Meßwerte erfaßt. Für jede Oberfläche werden sechs Einzelmessungen durchgeführt. Der Punkt, an dem der Probekörper erstmals mit der Wasseroberfläche in Berührung kommt, ist gekennzeichnet durch einen sprunghaften Anstieg der gemessenen Masse. Die erste gemessene Masse gilt für die Eintauchtiefe null.

3.3.5.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von 5-Hydroxy-L-tryptophan und rhBMP-2 sowie der Gesamtfluoreszenz von 5-Hydroxy-L-tryptophan

Zur Ermittlung der evaneszenten Anteile der Fluoreszenz von 5-Hydroxy-L-tryptophan (N_s^e) und rhBMP-2 (N_b^e) in der Bulkphase ist die Kenntnis der Extinktionskoeffizienten beider Stoffe und die Gesamtfluoreszenz des Standards (N_s^{tot} , Gl. 22) bei unterschiedlichen Konzentrationen erforderlich. Da in der Literatur weder für rhBMP-2 noch für 5-Hydroxy-L-tryptophan bei einem pH -Wert von 4,5 Extinktionskoeffizienten zur Verfügung stehen, wurden diese experimentell bestimmt. Zur Ermittlung der Extinktionskoeffizienten ist von jeder Substanz eine Konzentrationsreihe anzufertigen. Beim Standard 5-Hydroxy-L-tryptophan wird von einer 45,41 mM Stammlösung, für welche 200 mg des Standards in 20 ml 20 mM NaAc-Puffer ($pH = 4,5$) gelöst werden, ausgegangen. Aus dieser Stammlösung wird durch Herunterverdünnen eine Konzentrationsreihe hergestellt, welche die Konzentrationen von 4,54 µmol/l (1 µg/ml) bis 45,41 µmol/l (10 µg/ml) in 1 µg-Schritten umfaßt. Die Proteinstammlösung (hierzu, siehe **Kap. 3.3.6**) besitzt eine rhBMP-2-Konzentration von 35,34 µmol/l (918,9 µg/ml). Aus der Stammlösung wurde eine Konzentrationsreihe mit den Konzentrationen 0,127 µmol/l, 0,642 µmol/l, 2,138 µmol/l, 5,342 µmol/l, 10,688 µmol/l, 17,812 µmol/l, 25,446 µmol/l, 31,808 µmol/l und 35,342 µmol/l hergestellt. Von allen Lösungen sind am Photometer die Extinktionen zu messen und gegen die entsprechenden Konzentrationen aufzutragen, wie in

Abb. 23 zu sehen ist. Aus den Steigungen ergibt sich als Extinktionskoeffizient für den Standard der Wert $\varepsilon_S = 4622,0 \pm 63,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (**Abb. 23 A**) und für rhBMP-2 $\varepsilon_P = 35973 \pm 236 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (**Abb. 23 B**). Die Division der Extinktionskoeffizienten ergibt den Umrechnungsfaktor $f_F = 7,783$, der für die Berechnung der rhBMP-2-Menge auf der Oberfläche erforderlich ist. In **Kap. 2.3.2** wurde mit den Daten aus [106,108] ein Umrechnungsfaktor von $f_F = 6,337$ berechnet.

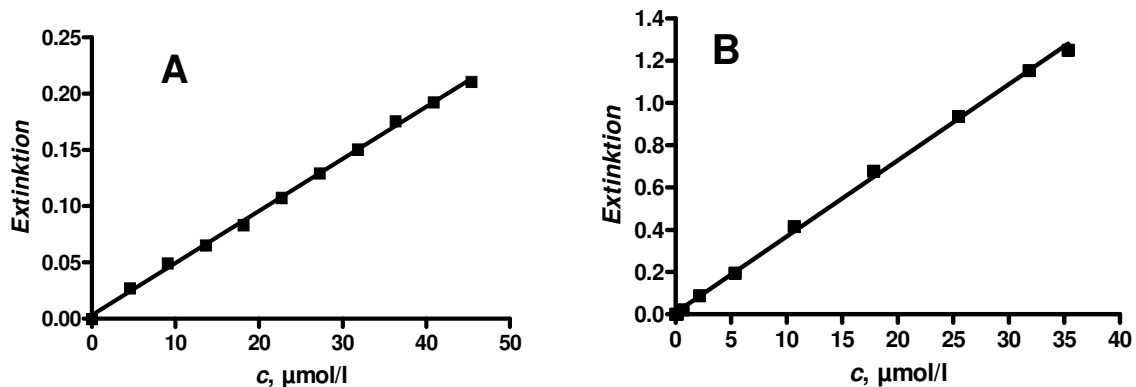


Abb. 23. Auftragungen zur Ermittlung der Extinktionskoeffizienten von **A** 5-Hydroxy-L-tryptophan ($\text{pH} = 4,5$) und **B** rhBMP-2 ($\text{pH} = 4,5$). Die Steigungen stellen die Extinktionskoeffizienten dar. Demnach besitzt 5-Hydroxy-L-tryptophan ($M = 220,23 \text{ g/mol}$) einen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_S = 4622,0 \pm 63,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Korrelationskoeffizient: $r^2 = 0,998$) und rhBMP-2 ($M = 25,8 \text{ kDa}$ [14]) einen von $\varepsilon_P = 35973 \pm 236 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($r^2 = 0,999$) bzw. $\varepsilon_S = 20,99 \pm 0,29 \text{ cm}^2/\text{mg}$ und $\varepsilon_P = 1,384 \pm 0,009 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Beide Substanzen wurden in Natriumacetatpuffer ($\text{pH} = 4,5$) gelöst. Die photometrischen Messungen wurden bei 285 nm mit 1 cm Kunststoffküvetten vorgenommen.

Die Messung der Gesamtfluoreszenz (Gl. 22) des Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan am TIRF-Rheometer muß mit höheren Konzentrationen vorgenommen werden, da die Empfindlichkeit der TIRF-Methode gegenüber gelöstem 5-Hydroxy-L-tryptophan bei UV-Licht begrenzt ist. Hierfür wird eine weitere Reihe von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen hergestellt. Diese umfaßt die Konzentrationen $0,045 \text{ mmol/l}$, $0,068 \text{ mmol/l}$, $0,091 \text{ mmol/l}$, $0,227 \text{ mmol/l}$, $0,363 \text{ mmol/l}$, $0,454 \text{ mmol/l}$, $0,908 \text{ mmol/l}$, $2,270 \text{ mmol/l}$, $4,541 \text{ mmol/l}$, $9,081 \text{ mmol/l}$ und $13,622 \text{ mmol/l}$.

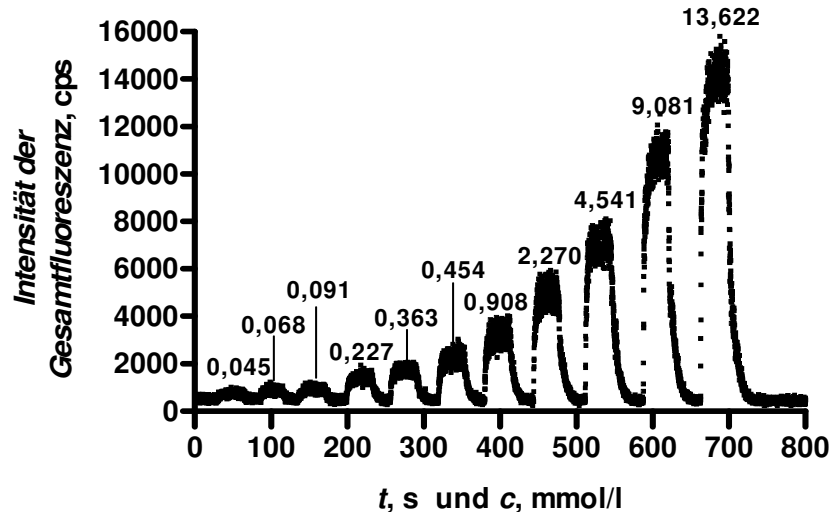


Abb. 24. Mit der TIRF-Zelle gemessene Gesamtfluoreszenzen (N_s^{tot}) von 5-Hydroxy-L-tryptophan. Die Zahlen auf den Signalmaxima bezeichnen die Konzentrationen der Standards in mmol/l, die im Wechsel mit NaAc-Puffer (pH = 4,5) eingeleitet wurden. Minima: Fluoreszenz ohne Tryptophan (Grundsignal).

Zur Bestimmung der Gesamtfluoreszenz N_s^{tot} der Standardlösungen (Gl. 22) werden diese nacheinander im Wechsel mit NaAc-Puffer, mit der geringsten Konzentration beginnend, in die TIRF-Meßzelle eingeleitet (siehe **Abb. 24**). Die Messung der Gesamtfluoreszenz von Standardlösungen erfolgt nur an reinem Quarzglas. Es wurde angenommen, daß modifizierte Quarzglasplatten die Fluoreszenzintensität der Standardlösungen nicht beeinflußt.

3.3.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes in Lösungen nach Lowry [221]

Die Bestimmung des rhBMP-2-Gehaltes erfolgt im kontinuierlichen Durchfluß am Technicon Auto-Analyzer 2 der Firma Bran+Luebbe GmbH (22844 Norderstedt) mit den Reagenzlösungen

- A: zweiproz. Lösung von wasserfreiem Natriumcarbonat in 0,1 M NaOH,
- B: 0,5 % Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, gelöst in einprozentiger Natriumtartratlösung und
- C: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Art.-Nr. 9001 (Merck, 64289 Darmstadt).

Prinzip dieses Versuchsaufbaus ist, daß die Reagenzlösungen und die Standardlösungen mit $c = 22 \mu\text{g/ml}$, $c = 46 \mu\text{g/ml}$, $c = 67 \mu\text{g/ml}$ bzw. $c = 91 \mu\text{g/ml}$ (Serumalbumin, gelöst in SDS (**Kap. 3.3.2**)) bzw. die rhBMP-2-Probelösungen im Auto-Analyzer an verschiedenen Orten zusammentreffen. Die Reagenzlösungen werden über die gesamte Meßdauer kontinuierlich in den Auto-Analyzer eingespeist. Zusätzlich werden kontinuierlich Luftblasen in das System eingepumpt. Von der Standard- bzw. Proteinlösung (= Probelösung) werden $0,3 \mu\text{l}$ automatisch eingezogen. Die Probelösung ist zu Beginn durch eine Luftblase von den Reagenzlösungen

getrennt. Zunächst trifft die Probelösung mit der Reagenzlösung B zusammen. Nach etwa zwei Minuten trifft diese Mischung auf die Reagenzlösung A um sich nach weiteren zwei Minuten mit der Reagenzlösung C zu vereinigen. Nach weiteren drei Minuten erreicht die Mischung die Durchflußzelle und die Extinktion des gebildeten Proteinfarbkomplexes kann bei einer Wellenlänge von $\lambda_{abs} = 660 \text{ nm}$ gemessen werden. Das Zusammenführen der einzelnen Lösungen erfolgt in den o. a. zeitlichen Abständen um erstens eine optimale Durchmischung zu erzielen und zweitens eine vollständige Ausbildung des Farbkomplexes zu gewährleisten. Vor jeder Meßreihe sind alle Leitungen und die Durchflußzelle mit SDS-Lösung (**Kap. 3.3.2**) zu spülen. Die Spülung ist beendet, wenn der Schreiber eine gerade Linie fährt. Erst dann werden die Reagenz- bzw. Probelösungen eingeleitet.

3.3.5.4 Quantifizierung von rhBMP-2 mittels Radioiodmethode

Neben der Quantifizierung von rhBMP-2 über Fluoreszenzmessungen, erfolgt sie auch mit Hilfe der Radioiodmethode. Hierzu wurde der rhBMP-2-Stammlösung mit einer Konzentration von $c = 11,5 \mu\text{mol/l}$ eine Lösung mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 zugegeben. Die Markierung des rhBMP-2 erfolgte mit Natriumiodid (Iodisotop ^{125}I) und mit Iodmonochlorid nach [95,222], wurde aber nicht selbst durchgeführt. Nach Messung der radioaktiven Stammlösung am γ -Counter (Perkin Elmer Automatic Gamma Counter 2480, PerkinElmer LAS GmbH, 63110 Rodgau), wurde eine spezifische Radioaktivität von 8,478 Mio. cpm/mg rhBMP-2 ermittelt mit welcher die Menge des adsorbierten rhBMP-2 berechnet wird.

3.3.6 Rekombinantes humanes knochenmorphogenetisches Protein (rhBMP-2) [80]

Für die Bindungsstudien wurde das Protein rhBMP-2 ausgewählt. In der Medizin ist unter anderem die Freisetzung von auf Implantaten immobilisiertes rhBMP-2 in die Umgebung des eingesetzten Implantates von wachsendem Interesse. Die Kenntnis von Desorptionsgeschwindigkeiten liefert nur qualitative Angaben zur Affinität von Proteinen zu Oberflächen. Quantitative Aussagen über Bindungskonstanten, sind nur bei Kenntnis der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten möglich. Da der Einsatz von rhBMP-2 in der Medizin stetig zunimmt [223], wurden mit diesem Protein Bindungsstudien durchgeführt.

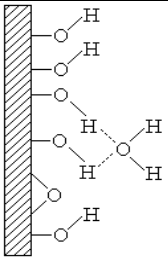
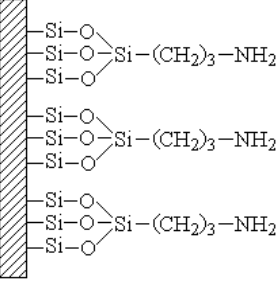
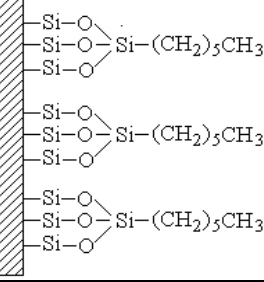
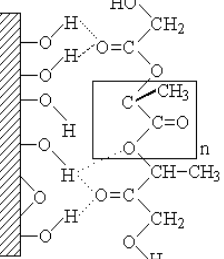
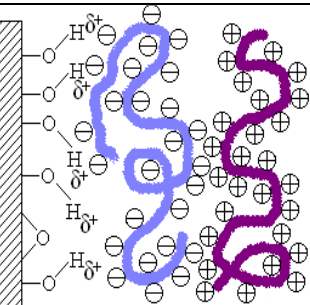
Das für die Experimente eingesetzte rhBMP-2 liegt als Dimer vor und besitzt eine Molmasse von 25,8 kDa. Die Herstellung des rhBMP-2 erfolgt in *E. coli* nach [80] und liegt danach zunächst als Lyophilisat vor, das aus einem Sucrose-Citratpuffer (5 g Sucrose und 1,47 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, $pH = 3,5$) hervorgeht. Infolge dessen muß es gegen 20 μM Natriumacetatpuffer ($pH = 4,5$) dialysiert werden. Die Dialyse erfolgt in drei Stufen gegen jeweils 5 l

NaAc-Puffer für etwa 8 Stunden bei 4 °C. Für die Dialyse wird ein Dialyseschlauch mit den Abmessungen 10 x 6 mm, Art.-Nr. D9277 (Fluka, 89555 Steinheim), verwendet. Dieser hält mehr als 90 % der Moleküle mit einer Molmasse von mindestens 12 kDa zurück. Der rhBMP-2-Gehalt des Dialysates wird nach der Methode von Lowry [221] gegen Albumin als Standard bestimmt (siehe **Kap. 3.3.5.3**). Das rhBMP-2, gelöst in Natriumacetatpuffer ($pH = 4,5$), besitzt einen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_P = 35973 \pm 236 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (siehe **Abb. 23 B**).

3.3.7 Verwendete Oberflächen

Für die Adsorptionsexperimente werden verschiedene Oberflächen eingesetzt. Das Studium der Adsorption von rhBMP-2 erfolgt an nativem Quarzglas (**Kap. 3.3.4.1** und **3.3.4.2**) mit einer Oberflächenrauigkeit von $Ra = 1 \text{ nm}$ [42] und einem Randwinkel von $\theta_{adv} = 0 \pm 0^\circ$, an Quarzglas, das mit (3-Aminopropyl)-trimethoxysilan (APS) (**Kap. 3.3.4.3**) mit $\theta_{adv} = 52 \pm 2^\circ$, Trichlorhexylsilan (THS) (**Kap. 3.3.4.3**) mit $\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$, Poly-DL-laktid (PDLLA) (**Kap. 3.3.4.4**) mit $\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$ und das abwechselnd mit Poly-L-glutaminsäure Natriumsalz (PGA) und Poly-L-lysin Hydrobromid (PLL) (**Kap. 3.3.4.5**) (θ_{adv} nicht bestimmt) behandelt wurde. Die Behandlung der Quarzglasplatten wird mit dem Ziel der Erzeugung unterschiedlicher Hydrophilien durchgeführt. Die Charakterisierung der Quarzglasplatten erfolgt über die Einteilung in Gruppen unterschiedlicher Hydrophilie. Diese ergibt sich aus der Bestimmung der Randwinkel (**Kap. 3.3.5.1**) nach der Wilhelmy-Plate-Methode. Da die Bestimmung von Randwinkeln nicht Schwerpunkt dieser Arbeit ist, erfolgte deren Behandlung im Grundlagen-Teil in **Kap. 2.10**. In **Tab. 3** sind schematisch die hypothetischen, chemischen Oberflächenstrukturen der Quarzglasplatten nach Behandlung mit den in **Kap. 3.3.4.1** bis **3.3.4.5** dargelegten Verfahren und die Randwinkel aufgeführt.

Tab. 3. Verwendete Oberflächen mit Charakterisierung durch Randwinkel.

Beschreibung der Oberfläche	Hypothetische, chemische Oberflächenstruktur	Vorrückwinkel θ_{adv}	Rückzugswinkel θ_{rev}
A native, unmodifizierte Quarzglasoberfläche Suprasil I [224]		$0^\circ \pm 0^\circ$	$0^\circ \pm 0^\circ$
B Quarzglasoberfläche, an der APS gebunden wurde [225-227]		$52^\circ \pm 2^\circ$	$18^\circ \pm 2^\circ$
C Quarzglasoberfläche, an der THS gebunden wurde*		$104^\circ \pm 2^\circ$	$84^\circ \pm 2^\circ$
D Quarzglasoberfläche, die mit PDLLA beschichtet wurde*		$82^\circ \pm 2^\circ$	$62^\circ \pm 2^\circ$
E Quarzglasoberfläche, an der im Wechsel PLL und PGA gebunden wurde [228]		$33^\circ \text{ bis } 63^\circ \text{ **}$	$29^\circ \text{ bis } 30^\circ \text{ **}$

In den Abbildungen symbolisieren die gestreiften Blöcke die mit CSS gereinigten Quarzglasoberflächen. **A:** Native Oberfläche. **B:** Kovalent gebundenes (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APS). **C:** Kovalent gebundenes Trichlorhexylsilan (THS). **D:** Poly-DL-laktid (PDLLA) vermutlich über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden (Beschichtung mit dem Spincoating-Verfahren). **E:** Polyglutamat (PGA, lila Strang) und Poly-L-lysin (PLL, violetter Strang) als Ausschnitt von 10 Doppelschichten. * Für **C** wurde eine kovalente Bindung analog **B** und für **D** eine Wasserstoffbrückenbindung angenommen. ** Randwinkel von Multilayern wurden nicht untersucht. Angegebene Randwinkel für PLL und Chondroitinsulfat aus [229].

3.3.8 Messung von Ankunfts-, Adsorptions- und Desorptionskinetiken

3.3.8.1 Vorbereitung der Meßzelle

Alle Arbeiten, die mit dem Zusammenbau der Durchflußzelle zusammenhängen, werden unter einer Flowbench (**Kap. 3.3.2**) durchgeführt, um jeglichen Staub fernzuhalten. Die Reinigung der Meßzellenbestandteile ist in **Kap. 3.3.2** beschrieben. Die benötigte, native (**Kap. 3.3.4.1** und **Kap. 3.3.4.2**) und ggf. modifizierte Quarzglasplatte (**Kap. 3.3.4.3** bis **Kap. 3.3.4.5**) wird in den ringförmigen Halter (**Abb. 21**) eingesetzt. Auf den Bereich, auf dem das Prisma fixiert wird, wird ein Tropfen wasserfreies Glycerin als Kontaktvermittler gegeben. Da Glycerin den gleichen Brechungsindex wie Quarzglas besitzt, wird der Strahlengang des Anregungslichtes nicht beeinflußt. Hiernach wird das gesäuberte und staubfreie Prisma aufgesetzt und mit den Metallbügeln festgeschraubt. Die beiden Durchbohrungen der Quarzglasplatte müssen nach dem Zusammenbau derart angeordnet sein, daß die Einlaßöffnung (**Abb. 22**) mehr mittig und die Auslaßöffnung links am Rand des Halteringes angeordnet ist. Nun werden die Plexiglas®-Stützen mit UHU plus schnellfest Zweikomponenten-Epoxidharzkleber festgeklebt. Unter leichtem Druck wird der Klebstoff etwa eine dreiviertel Stunde aushärten gelassen. Dann werden die Silikonschläuche vorsichtig auf die Stützen geschoben. Die fertigmontierte Durchflußzelle wird in das Rheometer eingesetzt und die Silikonschläuche mit den Peristaltikpumpen verbunden.

3.3.8.2 Allgemeine Bedingungen zur Einstellung des TIRF-Rheometerarrangements und allgemeine Verfahrensweisen [40]

Grundsätzlich werden für alle Messungen am TIRF-Rheometer die Blende 3 auf 1 mm und die Blenden 1, 2, 4 und 5 auf 4 mm eingestellt. Die Positionen der Blenden sind in **Abb. 19** dargestellt. Der Plexiglas®-Konus besitzt einen Winkel von einem Grad. Die Anregung von 5-Hydroxy-L-tryptophan und rhBMP-2 erfolgt bei $\lambda_{ex} = 285$ nm. Die Fluoreszenz wird bei $\lambda_{em} = 350$ nm gemessen. Außer bei den Desorptionen, werden alle Experimente unter Dauerbelichtung durchgeführt. Zur Untersuchung der Ankunfts- und Adsorptionskinetiken werden je Sekunde 10 Meßwerte aufgezeichnet. Die Desorptionsexperimente dürfen wegen des Photo-bleachings nicht unter Dauerbelichtung durchgeführt werden.

Vor jedem Experiment ist die Meßzelle für 5 Minuten mit NaAc-Puffer zu spülen. Bei Experimenten zur Bestimmung der Ankunftszeiten und bei den Adsorptionsexperimenten werden die Lösungen mit einer Durchflußrate von $\dot{V} = 145$ ml/h in die Meßzelle eingeleitet. Bei den Desorptionsexperimenten erfolgt die Einleitung der Pufferlösung mit einer Durchfluß-

geschwindigkeit von $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$. Bei allen Experimenten werden die Lösungen mit einer Durchflußgeschwindigkeit von $\dot{V} = 228 \text{ ml/h}$ ausgetragen. Die Experimente werden bei einer Temperatur von $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Für Experimente, bei denen die Lösungen ohne eine vorangehende Luftblase in die Meßzelle eingeleitet werden, ist die Peristaltikpumpe abzuschalten und der Einleitungsschlauch von der Pufferlösung in die Standard- bzw. Proteinlösung zu überführen, ohne daß in den Einleitungsschlauch Luft eintritt. Erst dann wird die Peristaltikpumpe wieder eingeschaltet. Bei Experimenten, bei denen die Lösungen mit einer vorangehenden Luftblase in die Meßzelle eingeleitet werden, bleibt die Peristaltikpumpe eingeschaltet. Der Einleitungsschlauch wird lediglich von der einen in die andere Lösung getaucht. Dies erfolgt in der Weise, daß während des Überführungsvorganges des Einleitungsschlauches etwa $70 \mu\text{l}$ Luft eingeblasen werden. Als Behelf kann der Schlauch an diesem Punkt markiert werden. Die Luft muß etwa 7 cm in den Einleitungsschlauch (Innendurchmesser $1,15 \text{ mm}$) eingeblasen werden.

3.3.8.3 Messung von Ankunfts kinetiken von 5-Hydroxy-L-tryptophan in der TIRF-Meßzelle [40]

Zur Untersuchung von Ankunfts kinetiken des nichtadsorbierenden Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan werden die Lösungen entweder mit oder ohne Scherung in die Meßzelle eingeleitet. Die Scherung ($\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$) wird durch einen rotierenden Konsus erzeugt. Bei Versuchen ohne Scherung ($\gamma = 0$) bleibt der Konus abgeschaltet. Unter beiden Bedingungen erfolgt die Einleitung des Standards einmal mit ($V = 70 \mu\text{l}$) und ein andersmal ohne vorangehende Luftblase. Für die Ankunfts kinetiken wird eine Standardlösung mit $c = 0,454 \text{ mmol/l}$, gelöst in 20 mM Natriumacetatpuffer ($\text{pH} = 4,5$), verwendet. Die Einleitung der Standardlösung erfolgt bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz. Zur Ausspülung des Standards wird der gleiche Puffer in die Meßzelle eingeleitet. Die Ausspülung ist beendet, wenn die Grundfluoreszenz N_0 (*Abb. 7*) erreicht ist.

3.3.8.4 Durchführung von Adsorptionen [40]

Die Adsorptionsexperimente werden mit unterschiedlichen Zielsetzungen durchgeführt, die sich aus dem Ergebnisteil ergeben. Für alle Adsorptionsexperimente wird rhBMP-2 in 20 mM Natriumacetatpuffer ($\text{pH} = 4,5$) verwendet. Höhere pH -Werte gehen mit einer beschränkten Löslichkeit des Proteins einher. Die Einleitung der Proteinlösungen wird mit Erreichen der maximalen Fluoreszenz beendet.

Zur Überprüfung des Luftblaseneffektes [22,42] wird eine Proteinlösung mit $c = 3,45 \mu\text{mol/l}$ einmal mit ($70 \mu\text{l}$) und ein andermal ohne Luftblase in die Meßzelle eingeleitet. Alle anderen Adsorptionsexperimente werden grundsätzlich mit einer vorangehenden Luftblase durchgeführt. Die Scherrate beträgt immer $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Zur Untersuchung der Adsorption von rhBMP-2 an unterschiedlichen Oberflächen (siehe **Tab. 3**), wird zur besseren Vergleichbarkeit nur eine Proteinkonzentration von $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ verwendet.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante von rhBMP-2 an nativem Quarzglas bzw. an immobilisiertem PDLLA, werden verschiedene Proteinkonzentrationen eingesetzt. Für die Bindungsstudien an nativem Quarzglas werden rhBMP-2-Konzentrationen von $c = 0,38, 0,48, 0,96, 1,73, 1,92, 3,45, 3,85, 5,69, 12,69$ und $19,23 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Von jeder Konzentration werden vier Einzelerperimente durchgeführt. Für die Bindungsstudien an immobilisiertem PDLLA werden drei Experimente je Konzentration durchgeführt. Hierzu werden Proteinkonzentrationen von $c = 0,142, 0,385, 0,769, 1,154$ und $1,538 \mu\text{mol/l}$ verwendet.

3.3.8.5 Durchführung von Desorptionen [40]

Für die Desorptionsexperimente muß zunächst das rhBMP-2 adsorbiert werden. Dies erfolgt entsprechend der Erläuterungen im vorangegangenen Kapitel mit einer Proteinlösung der Konzentration $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$. Adsorption und Desorption erfolgen bei einer Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Nach der Adsorption erfolgt eine Gleichgewichtseinstellung (Inkubation) über 500 s bzw. über 19 h in einer rhBMP-2-Lösung mit $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$. Für die Gleichgewichtseinstellung über 500 s wird nach Erreichen der maximalen Fluoreszenz der Durchfluß gestoppt und die Proteinlösung für 500 s in der Meßzelle belassen. Für die Gleichgewichtseinstellung über 19 h muß die Proteinlösung über eben diesen Zeitraum im Kreislauf durch die Meßzelle geführt werden. Nach der Gleichgewichtseinstellung in rhBMP-2-Lösung, wird in die Meßzelle 500 s lang 8 mM PBS ($\text{pH} = 7,4$) durchgeleitet. Anschließend erfolgt die Elution mit PBS-Puffer (Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$) im Durchfluß ($\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$). Ein weiteres Desorptionsexperiment erfolgt mit $20 \mu\text{M}$ Natriumacetatpuffer ($\text{pH} = 4,5$) als Elutionsmittel. Die Belichtungszeiten bei den Desorptionsexperimenten liegen zwischen 5 und 10 s , die Verschußzeiten zwischen 290 und etwa 1700 s . Aus technischen Gründen muß alle 10 s eine Fluoreszenzmessung (auch bei geschlossener Blende) vorgenommen werden. Die Desorptionsexperimente am TIRF-Rheometer verlaufen zwischen 48 und 124 h .

3.3.8.6 Bufferflush [20]

Beim Bufferflush wird die Proteinlösung in der Meßzelle durch die Pufferlösung ausgetauscht, so daß die Fluoreszenz um die Fluoreszenz der Proteinlösung absinkt. In Vorbereitung auf die Bufferflushexperimente muß zunächst eine Adsorption bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz gemäß **Kap. 3.3.8.4** durchgeführt werden. Im Anschluß wird die Proteinlösung mit PBS-Puffer ausgespült, so daß ein Fluoreszenzabfall resultiert. Der Fluoreszenzabfall stellt die Gesamtfluoreszenz N_b^{tot} (Gl. 22) der Proteinlösung in der Bulkphase dar.

3.3.8.7 Untersuchung der Fluoreszenz von adsorbiertem rhBMP-2 nach einer Verweildauer von 47 Stunden auf der Oberfläche

Um zu überprüfen, ob sich die Fluoreszenz bei Ausdehnung der Inkubationsdauer ändert, wird nach erfolgter Adsorption ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) 47 h lang eine Proteinlösung durch die Meßzelle geleitet. Am Anfang und am Ende des Experimentes, wird für wenige Sekunden die Fluoreszenz gemessen. Dabei werden je Sekunde 10 Meßwerte gemessen.

3.3.9 Photobleachexperimente

Für die Photobleachexperimente werden zunächst Adsorptionen aus rhBMP-2-Lösungen mit $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ (**Kap. 3.3.8.4**) und anschließend Inkubationen für jeweils 500 s zuerst in rhBMP-2-Lösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) und dann in PBS-Puffer durchgeführt. Unter Dauerbelichtung wird über 3000 s der Abfall der Fluoreszenz gemessen. Das Experiment wird bei einer Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ in stehendem (kein Durchfluß) PBS-Puffer durchgeführt. Jede Sekunde werden 10 Meßwerte aufgezeichnet.

3.3.10 Adsorption von radioaktiv markiertem rhBMP-2 am TIRF-Rheometer zur Bestimmung der Quenchfaktoren

Zur Bestimmung der maximalen Oberflächenkonzentration werden die Adsorptionsexperimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 (**Kap. 3.3.5.4**) ebenfalls am TIRF-Rheometer im Isotopenlabor durchgeführt. Die zusätzliche Beobachtung der Fluoreszenz wäre zwar wünschenswert, um das Erreichen des Adsorptionsgleichgewichtes feststellen zu können, doch kann aus sicherheitstechnischen Erfordernissen nur das Rheometer (Buchstabe **T** in **Abb. 19**) ohne die restlichen Bestandteile des TIRF-Arrangements (siehe **Abb. 19**) in den entsprechenden Laboratorien verwendet werden. Als Abbruchszeiten für die Adsorptionsexperimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 wird das fünffache der Halbwertszeit verwendet, wie sie sich aus den Adsorptionsexperimenten bis zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz ergibt. Für

die Adsorptionsexperimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 sind die Konzentrationen der Lösungen und die Adsorptionsdauern in **Tab. 4** aufgeführt.

Tab. 4. Konzentrationen der rhBMP-2-Lösungen und Abbruchzeiten.*

Konzentration der rhBMP-2-Lösung	Adsorptionsdauer
0,385 $\mu\text{mol/l}$	100 s
0,962 $\mu\text{mol/l}$	50 s
1,92 $\mu\text{mol/l}$	50 s
3,85 $\mu\text{mol/l}$	30 s
7,69 $\mu\text{mol/l}$	20 s

* Abbruchzeit: fünffache Halbwertszeit aus den Adsorptionsexperimenten beim Erreichen der maximalen Fluoreszenz.

Nach erfolgter Adsorption wird die Quarzglasplatte aus der TIRF-Meßzelle entnommen und zerbrochen. Die Quarzglasplatten müssen zerbrochen werden, da sie als ganzes nicht in die Meßküvetten passen. Die Verwendung größerer Meßküvetten ist im verwendeten γ -Counter (**Kap. 3.3.5.4**) nicht möglich. Das Zerbrechen der Quarzglasplatten erfolgt in einem Zellstofftuch durch leichte Schläge und ist solange durchzuführen, bis das Zellstofftuch mitsamt den Bruchstücken in Meßküvette zur Radioaktivitätsmessung paßt. Da die Quarzglasplatten mit 100 € sehr teuer sind, wird für jede Konzentration nur ein Adsorptionsexperiment mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 durchgeführt. Die Division der Beladungen aus der Radioiodmethode durch die Beladungen, die aus der Fluoreszenz berechnet werden, ergibt die Quenchfaktoren.

3.3.11 Desorption von radioaktiv markiertem rhBMP-2

Es werden drei Desorptionsexperimente parallel durchgeführt. Zu Beginn werden drei rechtwinklige Quarzglasplättchen mit den Abmessungen 5 x 10 x 1 mm (**Kap. 3.3.4**) für 19 h in einer rhBMP-2-Lösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen inkubiert. Größere Quarzglasplatten können nicht in die Durchflußzellen eingesetzt werden. Zwecks besserer Durchmischung werden die Eppendorf-Gefäße für die Dauer der Inkubation in einen Horizontalschüttler eingespannt. Vor Verwendung der Inkubationslösung ist ein definiertes Volumen von etwa 200 μl zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität zurückzustellen. Nach Beendigung der Inkubation werden die Quarzglasplatten den Eppendorf-Gefäßen

entnommen und fünfmal mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$) gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Für die Desorptionsexperimente werden die Quarzglasplatten jeweils in eigene, zusammenschraubbare Durchflußzellen [230] gebracht. Die Elution ($\dot{V} = 10 \text{ ml/h}$) erfolgt mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$). Im Abstand von einem bis drei Tagen wird der Durchfluß gestoppt und zur Messung der Radioaktivität die Quarzglasplatten aus den Durchflußzellen entnommen und einmal mit PBS-Puffer abgespült. Die Radioaktivität der Quarzglasplatten darf nicht zusammen mit der Durchflußzelle gemessen werden, da diese etwa 5 % rhBMP-2, bezogen auf die Menge des auf der Quarzglasplatte gebunden Proteins, adsorbieren. Zeitnah wird die spezifische Radioaktivität der o. a. zurückgestellten Inkubationslösung ermittelt. Nach dem Ende der Radioaktivitätsmessungen werden die Quarzglasplatten wieder zurück in die Durchflußbehälter gesetzt und die Elution fortgesetzt. Bis zum Erreichen eines Plateaus wird in der Weise weiter verfahren. Auf Desorptionsexperimente von radioaktiv markiertem rhBMP-2 am TIRF-Rheometer muß verzichtet werden, um große Mengen radioaktiven Eluats (etwa 11 l bei einer Durchflußrate von $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$) zu vermeiden. Eine Reduktion der Durchflußrate am TIRF-Rheometer auf $\dot{V} = 10 \text{ ml/h}$ ist nicht möglich, da der Zelleninhalt dann eintrocknet oder der Zu- oder Abfluß der Durchflußzelle verstopft.

3.3.12 Rechenprogramm und statistische Behandlung der Meßdaten

Die Meßwerte werden mit dem Programm DataMax Version 1.03 (Fa. Jobin Yvon Spex, Grasbrunn) erfaßt. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Computerprogramm GraphPad Prism Version 4 (Fa. Graphpad, San Diego, CA). Die Auswertung beschränkt sich im wesentlichen auf die Anpassung an Exponentialfunktionen und hyperbolischen Funktionen, die im folgenden aufgeführt sind.

Einphasige Exponentialfunktion für Adsorptionen:

$$\Gamma = \Gamma_{max} - \Gamma_{max} \cdot e^{-k_{obs}t} \quad (88)$$

Γ ist die Oberflächenkonzentration zum Zeitpunkt t . Γ_{max} ist die Oberflächenkonzentration beim apparenten Adsorptionsgleichgewicht. Die Steigung der Anpassung ist die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante k_{obs} . Gl. 88 entspricht Gl. 73. Für die Oberflächenkonzentrationen können wahlweise auch die Fluoreszenzen eingesetzt werden, siehe auch Gl. 74.

Zweiphasige Exponentialfunktion für Adsorptionen:

$$\Gamma = (\Gamma_{max,A} - \Gamma_{max,A} \cdot e^{-k_{obs,A}t}) - (\Gamma_{max,B} - \Gamma_{max,B} \cdot e^{-k_{obs,B}t}) \quad (89)$$

Adsorptionskinetiken, die an eine zweifach exponentielle Funktion angepaßt werden können, sind aus einer schnell- (Index *A*) und einer langsam (Index *B*) verlaufenden Phase zusammengesetzt. Die schnell verlaufende Phase der Adsorptionkinetik besitzt die Geschwindigkeitskonstante $k_{obs,A}$ und die langsam verlaufende Phase die Geschwindigkeitskonstante von $k_{obs,B}$. $\Gamma_{max,A}$ und $\Gamma_{max,B}$ sind die maximalen Oberflächenkonzentrationen für die entsprechenden Phasen.

Einphasige Exponentialfunktion für Desorptionen:

$$\Gamma = Span \cdot e^{-tk_{-1}} + Plateau \quad (90)$$

Bei den Desorptionsexperimenten wird das Grundrauschen (N_0 in **Abb. 7**) abgezogen und das Plateau in Gl. 90 auf null gesetzt, da bei vollständiger Freisetzung der adsorbierten Moleküle keine Moleküle mehr auf der Oberfläche vorhanden sein können. Der Span beschreibt die maximale Oberflächenkonzentration und wird in der vorliegenden Arbeit in Prozenten angegeben. Bei anderen Anpassungen, wie z. B. bei der Auftragung der Quenchfaktoren gegen die Oberflächenkonzentrationen, ist die Lage des Plateaus unbekannt. k_{-1} ist die Desorptiongeschwindigkeitskonstante.

Zweiphasige Exponentialfunktion für Desorptionen:

$$\Gamma = Span1 \cdot e^{-k_{-2}t} + Span2 \cdot e^{-k_{-3}t} + Plateau \quad (91)$$

Im wesentlichen gilt das für die Gl. 90 beschriebene, nur, daß hier zwei Desorptiongeschwindigkeitskonstanten, k_{-2} für die schnellere Reaktion und k_{-3} für die langsamere Reaktion, erhalten werden. Span1 gibt die freigesetzte Menge des schneller desorbierenden Moleküls in der ersten Phase und Span2 die Menge des langsamer desorbierenden Moleküls in der zweiten Phase an.

Einfache hyperbolische Anpassung:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{max}^s \cdot c}{K_D + c} \quad (92)$$

In Analogie zu Langmuir-Gleichung wird die einfache hyperbolische Anpassung verwendet. Γ_{max} ist die maximale Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht. Auch bei Anwendung von Lösungen mit theoretisch unendlich hohen Konzentrationen kann der Γ_{max} -Wert

niemals überschritten werden. Die Gleichgewichtskonzentration c des gelösten Stoffes liegt im apparenten Adsorptionsgleichgewicht vor. K_D' ist die Halbsättigungskonstante; ihr Reziprokwert ist die Bindungskonstante K_A' . Ab dem Ergebnisteil wurde beim Formelzeichen K_A' der Index A fortgelassen.

Doppelte hyperbolische Anpassung:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{max,A}^S \cdot c}{K_{D,A}' + c} + \frac{\Gamma_{max,B}^S \cdot c}{K_{D,B}' + c} \quad (93)$$

Bei der doppelten hyperbolischen Anpassung sind die Größen $K_{D,A}'$ und $K_{D,B}'$ die Halbsättigungskonstanten, bzw. deren Reziprokwerte die Bindungskonstanten $K_{A,A}'$ und $K_{A,B}'$. Sehr kleine Bindungskonstanten können über diese Anpassung oftmals nicht gefunden werden. Die Beladungen $\Gamma_{max,A}$ und $\Gamma_{max,B}$ gelten für die adsorbierten Spezies mit den Halbsättigungskonstanten $K_{D,A}$ und $K_{D,B}$. Bei den Bindungsstudien mit rhBMP-2, liegen auf der Oberfläche Spezies mit unterschiedlichen Affinitäten vor. So besitzt die schneller desorbierende Spezies eine geringere Affinität als die langsamer desorbierende Spezies.

Werden Meßdaten (x vs. y) an ein mathematisches Modell angepaßt, so ist die Anpassung auf Signifikanz in bezug auf das gewählte Anpassungsmodell zu überprüfen. Diese Prüfung erfolgt mit einem Residual Runs Test und führt zu einer Auftragung der ursprünglichen x -Werte gegen sog. Residuale um eine Waagerechte. Diese Auftragung wird als Residualplot bezeichnet. Den Abstand eines Datenpunktes von der Anpassungskurve bezeichnet man als Residual. Im Residualplot liegen die Datenpunkte oberhalb und unterhalb der Waagerechten. Aufeinanderfolgende, z. B. oberhalb der Waagerechten im Residualplot liegende Datenpunkte, stellen einen Run dar. Findet sich der nächste Punkt unterhalb der Anpassungskurve, beginnt der zweite Run u.s.w. Die Runs oberhalb und unterhalb der Anpassungskurve müssen zufällig aufeinander folgen (Nullhypothese). Ergibt der Residual Runs Test einen Residualwert von $P > 0,050$, so ist das gewählte Anpassungsmodell optimal.

Die Angabe der Fehler erfolgt als Standardfehler. Bei Mittelwerten von mehreren Meßwerten werden die Fehler der einzelnen Meßwerte aus geometrischen Mitteln gebildet [231]. Der Hinweis auf Fehler aus der geometrischen Mittelwertbildung erfolgt durch den Ausdruck $\bar{x} \pm x_G$. In Klammern ist die Anzahl der zur Mittelwertbildung verwendeten Meßwerte mit angegeben. Bei zusammengesetzten Größen wie z. B. den Korrekturfaktoren oder Bindungskonstanten werden die Fehler über das Fehlerfortpflanzungsgesetz für den Größtfehler nach dem

Taylor'schen Satz ermittelt [232]. Hiernach hängt eine zu bestimmende Größe y von den Meßgrößen $x_1, x_2 \dots$ ab, so daß [232]

$$y = f(x_1, x_2 \dots) \quad (94)$$

ist. Unter der Bedingung, daß $\Delta y_i \ll y_i$ ($x_i = 1, 2, 3 \dots$) und $\left(\frac{\partial y}{\partial x_i}\right) \gg \left(\frac{\partial^2 y}{\partial x_i^2}\right)$ ist, gilt für den Fehler von y [232]

$$\Delta y = \left| \left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \right) \right| \Delta x_1 + \left| \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \right) \right| \Delta x_2 + \dots \quad (95)$$

Die Ableitung des totalen Differentials nach den beeinflussenden Größen $x_1, x_2 \dots$ ergibt schließlich

$$\Delta y = \left| \frac{1}{x_2} \Delta x_1 \right| + \left| -\frac{x_1}{x_2^2} \Delta x_2 \right| + \dots \quad (96)$$

Ergebnisse aus Einzelmessungen werden mit Standardfehler oder Standardabweichung angegeben. Der Hinweis auf Standardfehler erfolgt durch den Ausdruck $\bar{x} \pm S.E.$ und bei der Standardabweichung über den Ausdruck $\bar{x} \pm S.D.$

4 Ergebnisse

4.1 Ankunfts kinetiken

Bei der Einleitung von Lösungen mit fluoreszenzfähigen Molekülen in die TIRF-Meßzelle, wird ein Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Dieser verläuft zunächst schnell, mit zunehmender Zeit immer langsamer, bis schließlich die maximale Fluoreszenz erreicht wird. Die maximale Fluoreszenz wird beim nichtadsorbierenden Standard 5-Hydroxy-L-tryptophan gemessen, wenn an jedem Ort in der Meßzelle die Endkonzentration vorliegt. Im Gegensatz dazu, adsorbieren Proteinmoleküle meistens an der Oberfläche. Bei der Einleitung von rhBMP-2-Lösungen in die Meßzelle, wird die maximale Fluoreszenz gemessen, wenn auf der Oberfläche ein apparentes Gleichgewicht (siehe **Kap. 2.8**) vorliegt. Die Dauer dieser Gleichgewichtseinstellung sowie die Höhe der gemessenen maximalen Fluoreszenz sind abhängig von der Konzentration der verwendeten Proteinlösung. Die Zeit, die verstrichen ist, bis die Hälfte der maximalen Fluoreszenz an der Oberfläche gemessen wird, soll zunächst als Ankunfthalbwertszeit bezeichnet werden. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurde die Anzahl der Photonen pro Sekunde (Einheit: cps = counts per seconds [233]) mit einem Photomultiplier (**Abb. 19**) gemessen.

4.1.1 Ankunfts kinetiken von 5-Hydroxy-L-tryptophan

Zur Untersuchung der Ankunfthalbwegszeiten am TIRF-Rheometer wurden Lösungen von 5-Hydroxy-L-tryptophan eingesetzt. Da die Substanz nicht an der Oberfläche adsorbiert, führt das Ausspülen der 5-Hydroxy-L-tryptophanlösung mit Pufferlösung zu einer vollständigen Absenkung der Fluoreszenz auf den ursprünglichen Wert, der als Grundrauschen bezeichnet wird (in **Abb. 7** die Größe N_0). Mit 5-Hydroxy-L-tryptophan als Standard, kann die Oberflächenkonzentration von adsorbierten Proteinen bestimmt werden, sofern das Protein Tryptophangruppen besitzt. Die Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen führt zu exponentiell verlaufenden Fluoreszenzanstiegen. Die Größe der Ankunfthalbwegszeiten wurde beeinflusst, indem die Standardlösungen entweder mit oder ohne vorangehende Luftblase in die Meßzelle eingeleitet wurden oder indem die Scherrate durch einen rotierenden bzw. nichtrotierenden Konus (**Kap. 3.3.8.3**) variiert wurde. Alle Untersuchungen fanden im Durchfluß ($\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$) statt. Die Bestimmung des Initialpunktes wird im anschließenden **Kap. 4.1.2** erläutert.

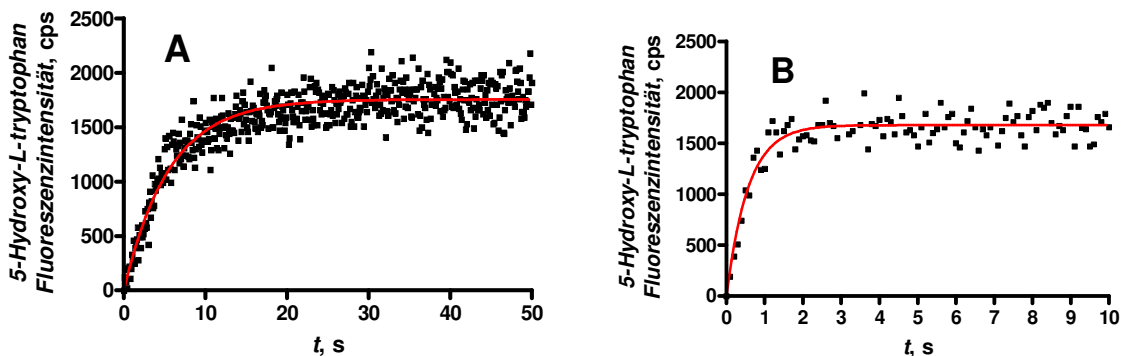


Abb. 25. Fluoreszenzanstieg bei der Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösung (ohne Scherung, $\gamma = 0$). **A:** Einleitung der Standardlösung ($c = 0,454 \text{ mM}$ in NaAc-Puffer) ohne vorangehende Luftblase, $t_{1/2} = 3,84 \pm 0,10 \text{ s}$, $P = 0,571$ ($r^2 = 0,860$). **B:** Einleitung des Standards mit vorangehender Luftblase ($V = 70 \mu\text{l}$), $t_{1/2} = 0,39 \pm 0,03 \text{ s}$, $P = 0,083$ ($r^2 = 0,846$). Beide Kinetiken wurden angepaßt an eine einfache exponentielle Funktion (rote Kurven). Volumenstrom: $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$. $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$. $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ Zu den Fehlern siehe **Kap. 3.3.12**.

In **Abb. 25** ist die Fluoreszenzänderung bei der Einleitung einer Standardlösung ($c = 0,454 \text{ mmol/l}$) in die Meßzelle zu sehen. Beide Experimente wurden ohne rotierenden Konus also ohne Scherung ($\gamma = 0$) durchgeführt. **Abb. 25 A** zeigt eine Ankunfts kinetik, bei der die Standardlösung ohne eine vorangehende Luftblase in die Meßzelle eingeleitet wurde. An der Oberfläche liegt nach etwa 20 s (Halbwertszeit $t_{1/2} = 3,84 \pm 0,10 \text{ s}$) die Endkonzentration

vor. Die Endkonzentration entspricht der Konzentration der eingesetzten Standardlösung. Die Ankunfts kinetik wurde an eine einfach exponentielle Funktion angepaßt. Der Residualwert beträgt $P = 0,571$ und der Korrelationskoeffizient ist $r^2 = 0,860$. Erfolgt die Einleitung der Standardlösung (gleiche Konzentration) mit einer vorangehenden Luftblase, wie dies in **Abb. 25 B** dargestellt ist, wird die Endkonzentration bereits nach 2 s ($t_{1/2} = 0,39 \pm 0,03$ s) erreicht. Auch diese Kinetik wurde an eine einfache exponentielle Funktion ($P = 0,083$, $r^2 = 0,846$) angepaßt. In **Tab. 5** sind die Ergebnisse für fünf Experimente dargestellt.

Tab. 5. Vergleich von Ankunfts halbwertszeiten (Scherrate: $\gamma = 0$) bei der Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophan ohne und mit Luftblase.*

Experimente ohne Scherrate	Einleitung ohne vorangehende Luftblase			Einleitung mit vorangehender Luftblase		
	$t_{1/2}$, s	P	r^2	$t_{1/2}$, s	P	r^2
1	$3,67 \pm 0,10$	0,433	0,845	$0,39 \pm 0,03$	0,083	0,846
2	$5,35 \pm 0,13$	0,337	0,885	$0,41 \pm 0,04$	0,130	0,895
3	$5,43 \pm 0,14$	0,735	0,880	$0,46 \pm 0,04$	0,812	0,805
4	$3,12 \pm 0,09$	0,652	0,824	$0,49 \pm 0,03$	0,466	0,866
5	$3,84 \pm 0,10$	0,571	0,860	$0,55 \pm 0,05$	0,511	0,879
Mittelwert	$4,28 \pm 0,11$	-	-	$0,46 \pm 0,04$	-	-

* Volumen der Luftblase 70 μ l. $\dot{V} = 145$ ml/h. Standardkonzentration $c = 0,454$ mmol/l. Fehler der Einzelwerte: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler der Mittelwerte: $\bar{x} \pm x_G$ ($n = 5$). Zu den Fehlern siehe **Kap. 3.3.12**.

Alle Ankunfts kinetiken konnten an eine einfache exponentielle Funktion angepaßt werden ($P \geq 0,05$), siehe auch [40,234]. Die Anwendung einer vorangehenden Luftblase bei der Einleitung der Standardlösung führt im Mittel zu einer neun- bis zehnfachen Verkürzung der Ankunfts halbwertszeiten von $t_{1/2} = 4,28 \pm 0,11$ s auf $t_{1/2} = 0,46 \pm 0,04$ s.

Bei den folgenden Experimenten liegt eine Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ vor, die durch einen rotierenden Konus erzeugt wird (Buchstabe **A** in **Abb. 20** und **21**). In **Abb. 26** ist der Einfluß der Luftblase auf den Fluoreszenzverlauf bei der Einleitung einer 5-Hydroxy-L-tryptophan-lösung ($c = 0,454$ mmol/l) dargestellt. Alle gefundenen Ankunfts kinetiken konnten an einfache exponentielle Funktionen anpaßt werden.

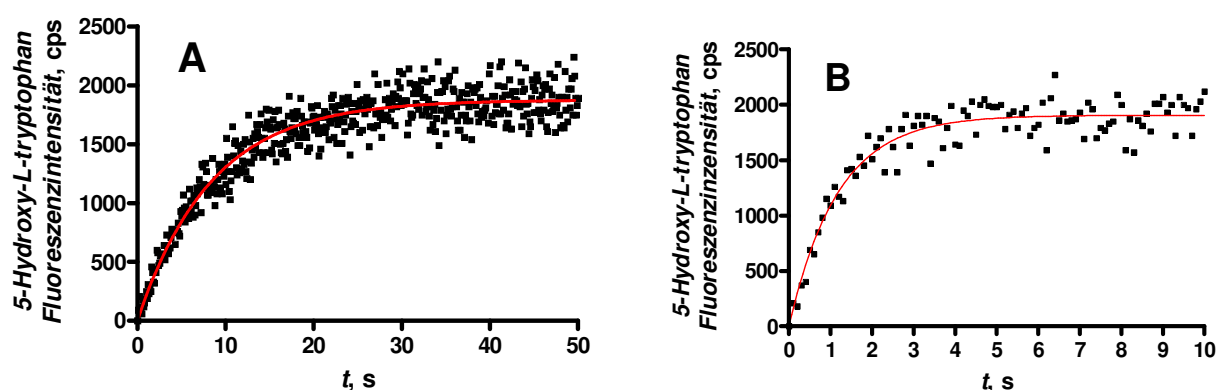


Abb. 26. Fluoreszenzanstieg bei der Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösung (mit Scherung, $\gamma = 720 \text{ s}$). **A:** Einleitung der Standardlösung ($c = 0,454 \text{ mM}$ in NaAc-Puffer) ohne vorangehende Luftblase, $t_{1/2} = 5,84 \pm 0,13 \text{ s}$, ($P = 0,483$, $r^2 = 0,915$). **B:** Einleitung des Standards mit vorangehender Luftblase ($V = 70 \mu\text{l}$), $t_{1/2} = 0,82 \pm 0,04 \text{ s}$, $P = 0,590$, $r^2 = 0,907$. Beide Kinetiken wurden angepaßt an eine einfache exponentielle Funktion (rote Kurven). Volumenstrom: $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$. $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$. $\bar{x} \pm S.E.$

Zunächst erfolgte die Einleitung der Standardlösung ohne Luftblase (**Abb. 26 A**). Es wurde eine Ankunftshalbwertszeit von $t_{1/2} = 5,84 \pm 0,13 \text{ s}$ gefunden ($P = 0,483$, $r^2 = 0,915$). Die Verwendung einer Luftblase (**Abb. 26 B**) führte zu einer Reduktion der Ankunftshalbwertszeit auf $t_{1/2} = 0,82 \text{ s}$ ($P = 0,590$, $r^2 = 0,907$). Die Ergebnisse von fünf Experimenten sind in **Tab. 6** aufgeführt.

Tab. 6. Vergleich von Ankunftshalbwertszeiten (Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$) bei der Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophan ohne und mit Luftblase.*

Experimente mit $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$	Einleitung ohne vorangehende Luftblase			Einleitung mit vorangehender Luftblase		
	$t_{1/2}, \text{s}$	P	r^2	$t_{1/2}, \text{s}$	P	r^2
1	$5,92 \pm 0,13$	0,258	0,909	$0,80 \pm 0,05$	0,580	0,877
2	$6,31 \pm 0,15$	0,430	0,905	$0,78 \pm 0,05$	0,767	0,857
3	$6,32 \pm 0,15$	0,315	0,907	$0,82 \pm 0,04$	0,590	0,907
4	$5,84 \pm 0,13$	0,483	0,915	$0,77 \pm 0,05$	0,278	0,831
5	$6,23 \pm 0,15$	0,676	0,900	$0,78 \pm 0,05$	0,084	0,853
Mittelwert	$6,12 \pm 0,14$	-	-	$0,79 \pm 0,05$	-	-

* Weitere Bedingungen siehe Legende unter **Tab. 5**. Fehler der Einzelwerte: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler der Mittelwerte: $\bar{x} \pm x_G$ ($n = 5$).

Im Mittel wurde durch die Anwendung der Luftblase die Ankunfthalbwegszeit von $t_{1/2} = 6,12 \pm 0,14$ s auf $t_{1/2} = 0,79 \pm 0,05$ s um das sieben- bis achtfache reduziert. Eine Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ führt zu einer geringen Erhöhung der Ankunfthalbwegszeiten von $t_{1/2} = 4,28 \pm 0,11$ s (**Tab. 5**) auf $t_{1/2} = 6,12 \pm 0,14$ s (**Tab. 6**), wenn keine Luftblase angewendet wird. Mit Anwendung einer Luftblase führt eine Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ zu einer Vergrößerung der Ankunfthalbwegszeiten von $t_{1/2} = 0,46 \pm 0,04$ s auf $t_{1/2} = 0,79 \pm 0,05$ s. In beiden Fällen ($\gamma = 0$ oder $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$) führt die Anwendung einer Luftblase bei der Einleitung der Standardlösung in die Meßzelle zu einer Verkürzung der Ankunfthalbwegszeiten um den Faktor sieben bis neun.

4.1.2 Bestimmung des Initialpunktes von Ankunfts- und Adsorptionskinetiken

Bei der Einleitung einer Lösung des Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan wurden ausschließlich Ankunfts-kinetiken erhalten, die an einfache exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten (siehe **Kap. 4.1.1**). Ein Ausschnitt einer solchen Ankunfts-kinetik ist in **Abb. 27** dargestellt. Sehr deutlich ist zu erkennen, ab welchem Punkt die Fluoreszenz signifikant ansteigt. Der davor liegende Meßpunkt ist der Initialpunkt, der den Beginn der Ankunfts-kinetik charakterisiert.

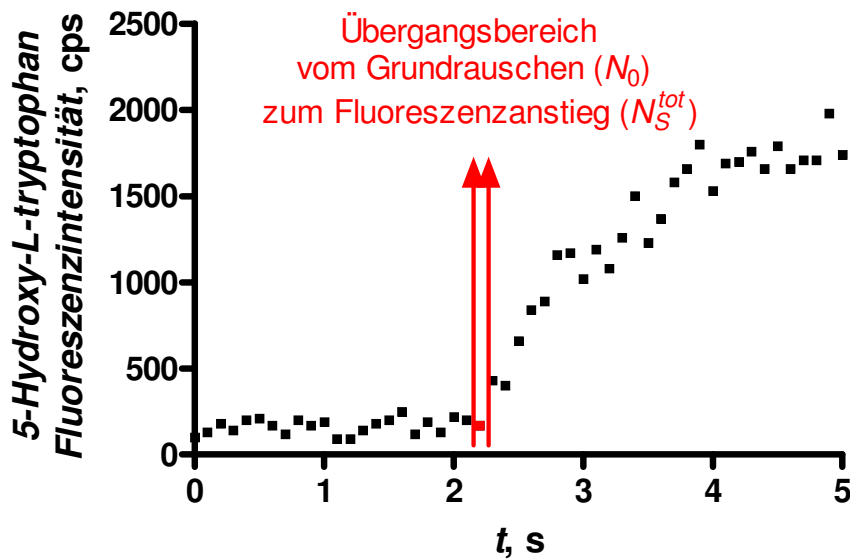


Abb. 27. Übergang der Fluoreszenz (N_0) bei Durchleitung von Puffer zur Fluoreszenz (N_s^{tot}) bei der Einleitung von 5-Hydroxy-L-tryptophan mit vorangehender Luftblase ($70 \mu\text{l}$). Zwischen den roten Pfeilen ($t = 2,2$ bis $2,3$ s) liegt der Übergangsbereich der Fluoreszenz (N_0) bei Durchleitung von Puffer (Grundrauschen) zur Fluoreszenz des Standards (N_s^{tot}). Nach $t = 2,2$ s (roter Meßpunkt) findet ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz statt (Erscheinen des Standards am Sensor). Standardkonzentration $c = 0,454 \mu\text{mol/l}$ in NaAc-Puffer ($\text{pH} = 4,5$). Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$.

In **Abb. 27** ist durch die beiden senkrechten Linien der Erwartungsbereich des Initialpunktes der Ankunfts kinetik des Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan ($c = 0,454 \mu\text{mol/l}$) eingezeichnet. Der Erwartungsbereich ist der Bereich, innerhalb dessen der Initialpunkt vermutet wird. In **Abb. 27** umfaßt er einen Zeitraum von 0,1 s. Eindeutig konnte ein starker Fluoreszenzanstieg bei $t = 2,3 \text{ s}$ lokalisiert werden. Hier erscheint der Standard an der Sensoroberfläche. Der davorliegende Punkt bei $t = 2,2 \text{ s}$ ist der Initialpunkt (roter Punkt) der Ankunfts kinetik. Während es sich beim 5-Hydroxy-L-tryptophan ($M = 220 \text{ g/mol}$) um ein kleines Molekül handelt, das nicht an der Oberfläche adsorbiert, liegt beim rhBMP-2 mit einer Molmasse von 25,8 kDa [59]) ein großes Molekül vor, das an der Oberfläche adsorbieren kann. Aus diesem Grunde stellt die zeitliche Veränderung der Fluoreszenz, die bei der Einleitung einer rhBMP-2-Lösung in die Meßzelle gemessen wird, den Verlauf der Adsorption von rhBMP-2 an der Oberfläche dar. Die Einleitung von Proteinlösungen mit einer vorangehenden Luftblase führt ebenfalls zu Kinetiken, die an exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten, siehe z. B. **Abb. 35** bis **39**. Der gemessene Fluoreszenzanstieg resultiert aus der Fluoreszenz des adsorbierten Proteins. Die Fluoreszenz der Proteinlösung kann nur ab einer Konzentrationen von $c = 12,69 \mu\text{mol/l}$ gemessen werden. Mit zunehmendem Anstieg der Fluoreszenz sinkt der Fehler. In **Abb. 28** sinkt der relative Fehler des Grundrauschens N_0 von 24 % auf 11 % bei der maximalen Fluoreszenz N_a .

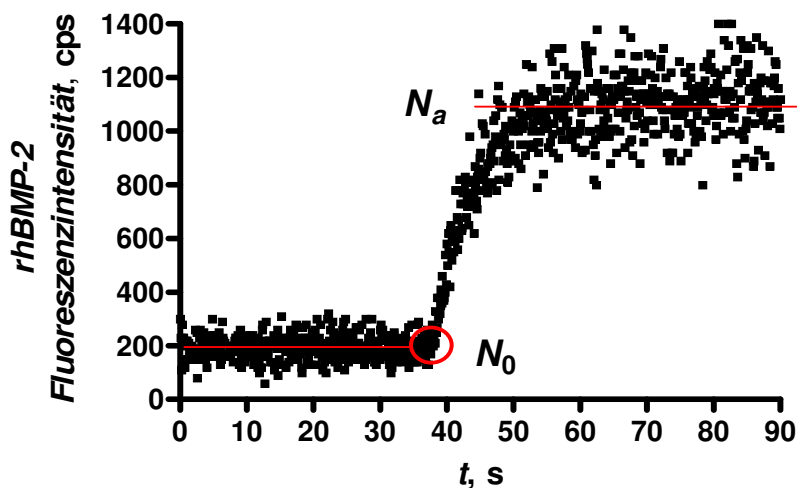


Abb. 28. Adsorptionskinetik von rhBMP-2 an Quarzglas. Einleitung des Puffers und anschließende Einleitung von rhBMP-2-Lösung. Bei etwa $t = 38 \text{ s}$ erreicht die Proteinlösung ($c = 3,45 \mu\text{mol/l}$) die Oberfläche und die Fluoreszenz steigt an (roter Kreis). Die Proteinlösung wurde mit einer vorangehenden Luftblase ($70 \mu\text{l}$) eingeleitet. Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Durchfluß: $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$. N_0 : Fluoreszenz bei Einleitung des Puffers (linke, waagerechte Linie). N_a : Fluoreszenz des adsorbierten Proteins bei Vorliegen des apparenten Adsorptionsgleichgewichtes (rechte, waagerechte Linie), siehe auch **Abb. 7**.

Bei einer Adsorption findet man üblicherweise einen Fluoreszenzverlauf, wie er in **Abb. 28** dargestellt ist. Dort wurde zunächst die Meßzelle mit einer Pufferlösung gespült, wobei die Fluoreszenz N_0 (linke, waagerechte Linie), das sog. Grundrauschen, gemessen wird. Dann erfolgt die Einleitung der Proteinlösung (hier $c = 3,45 \mu\text{mol/l}$) mit einer vorangehenden Luftblase (siehe **Kap. 3.3.8.4**). Bei etwa $t = 38 \text{ s}$ tritt die Proteinlösung in die Meßzelle ein (roter Kreis) und die Fluoreszenz steigt an. Die maximale Fluoreszenz N_a wird bei Vorliegen des Adsorptionsgleichgewichtes erreicht (rechte, waagerechte Linie). Auf der Oberfläche liegt dann für die gegebene Konzentration der Proteinlösung die maximale Proteinmenge vor (Sättigung). Innerhalb des roten Kreises beginnt der Fluoreszenzanstieg. Die folgende Abbildung stellt den rot eingekreisten Ausschnitt aus **Abb. 28** als Vergrößerung dar.

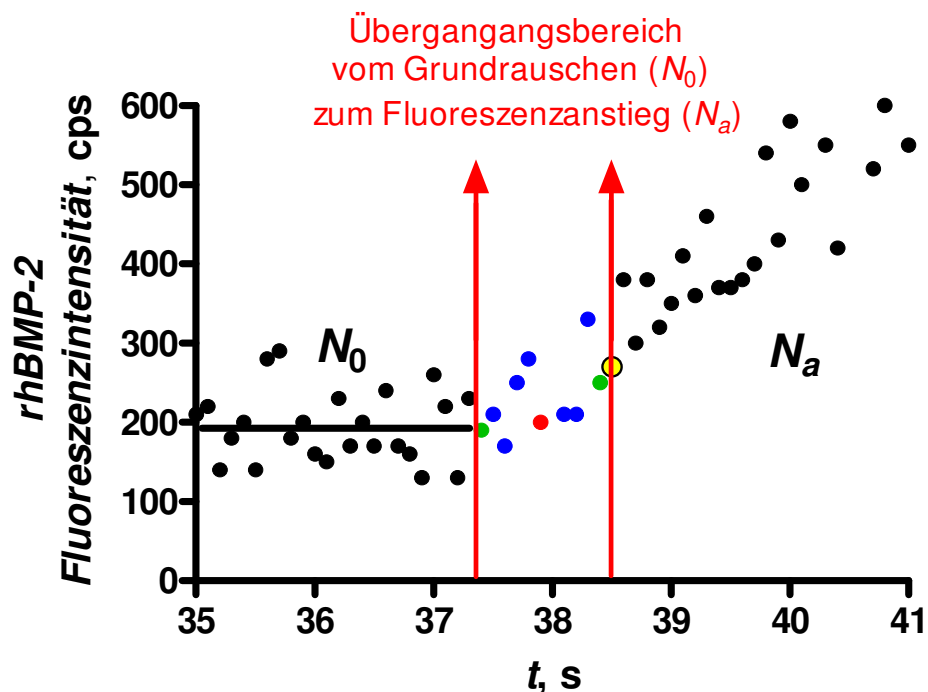


Abb. 29. Übergang der Fluoreszenz (N_0) bei Durchleitung von Puffer zur Fluoreszenz (N_a) bei der Einleitung einer rhBMP-2-Lösung mit vorangehender Luftblase ($70 \mu\text{l}$). Die Abbildung stellt den in **Abb. 28** rot eingekreisten Kinetikanteil als Ausschnitt dar. Zwischen den senkrechten roten Pfeilen liegt der Übergangsbereich der Fluoreszenz N_0 zur Fluoreszenz N_a . Dort können die Meßpunkte (bunte Punkte) nicht eindeutig den Fluoreszenzen N_0 und N_a zugeordnet werden. N_0 : Fluoreszenz bei Einleitung des Puffers (waagerechte Linie: $\bar{N}_0 = 195 \pm 47 \text{ cps}$, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 377$)). N_a : Fluoreszenz des adsorbierten Proteins. Schwarze Punkte: Meßpunkte eindeutig den Fluoreszenzen N_0 und N_a zuordnebar. Mit den Meßpunkten im Übergangsbereich als Initialpunkte erfolgten die exponentiellen Anpassungen (Daten, siehe **Tab. 7**). Blaue Punkte: Anpassungen ohne Abbildung. Grüne Punkte: Initialpunkt $t = 37,4 \text{ s}$ (**Abb. 30**) und $t = 38,4 \text{ s}$ (**Abb. 32**). Roter Punkt: Initialpunkt $t = 37,9 \text{ s}$ (**Abb. 31**). Gelber Punkt: Begrenzungspunkt für den Übergangsbereich (siehe folgenden Text). Weitere Bedingungen, siehe **Abb. 28**.

Die **Abb. 29** zeigt den Übergang der Grundfluoreszenz N_0 , die während der Einleitung des Puffers gemessen wird, zur Fluoreszenz N_a , wenn das Protein an der Quarzglasoberfläche adsorbiert. Meßpunkte, die eindeutig den Fluoreszenzen N_0 und N_a zugeordnet werden können, sind als schwarze Punkte dargestellt. Der Mittelwert für die Grundfluoreszenz (waagerechte Linie) beträgt $\overline{N}_0 = 195 \pm 47$ cps. Der Bereich zwischen den beiden roten Pfeilen (zur Lage der Pfeile, siehe weiter unten) wird als Übergangsbereich bezeichnet. Im Übergangsbereich befindet sich der Initialpunkt, doch ist im Übergangsbereich die Fluoreszenz weder der Grundfluoreszenz N_0 noch der Fluoreszenz N_a des adsorbierten Proteins eindeutig zuzuordnen (farbige Punkte). Das Auffinden des Initialpunktes durch die Anpassung an eine sigmoidale Funktion nach Boltzmann war nicht möglich. Daher soll eine statistische Methode vorgestellt werden, die den Initialpunkt für die Adsorption eindeutig zuordnet.

Die Meßpunkte im Übergangsbereich sind in **Abb. 29** farbig dargestellt. Die Begrenzung des Übergangsbereiches erfolgte zur rechten Seite an der Stelle, wo der erste Fluoreszenzmeßpunkt des adsorbierten Proteins (N_a) oberhalb des Mittelwertes des Grundrauschens $\overline{N}_0 = 195$ cps zuzüglich seines Fehlers $\Delta N_0 = 47$ cps liegt. Demnach liegt dieser Meßpunkt (umrandeter gelber Punkt in **Abb. 29**) bei der Fluoreszenz $N_a = 270$ cps und $t = 38,5$ s. Die linke Begrenzungslinie wurde eine Sekunde früher gesetzt. Mit jedem Meßpunkt aus dem Übergangsbereich wurde für die Adsorptionskinetik ein Anpassungsversuch an eine exponentielle Funktion vorgenommen. Hierzu wurde der gewählte Initialpunkt (Beginn der Adsorptionskinetik) in den Ursprung gesetzt. Die statistischen und kinetischen Daten aus den exponentiellen Anpassungen sind in **Tab. 7** zusammengestellt. Für die in **Abb. 29** blau dargestellten Meßpunkte sind die Anpassungen nicht abgebildet. Für die grün dargestellten Meßpunkte sind die Anpassungen in **Abb. 30** (Initialpunkt $t = 37,4$ s) und **Abb. 32** (Initialpunkt $t = 38,4$ s) dargestellt. Für den roten Meßpunkt (Initialpunkt $t = 37,9$ s) ist die Anpassung in **Abb. 31** dargestellt.

Die Güte der Anpassung wird durch den Korrelationskoeffizienten und dem Residualwert (P -Wert), der aus dem Residual-Runs-Test folgt, beschrieben. Das Anpassungsmodell besitzt keine signifikante Abweichung wenn $P \geq 0,05$ ist. Im folgenden sind mehrere Anpassungsversuche für die in **Abb. 28** bzw. **29** gezeigten Adsorptionskinetiken dargestellt.

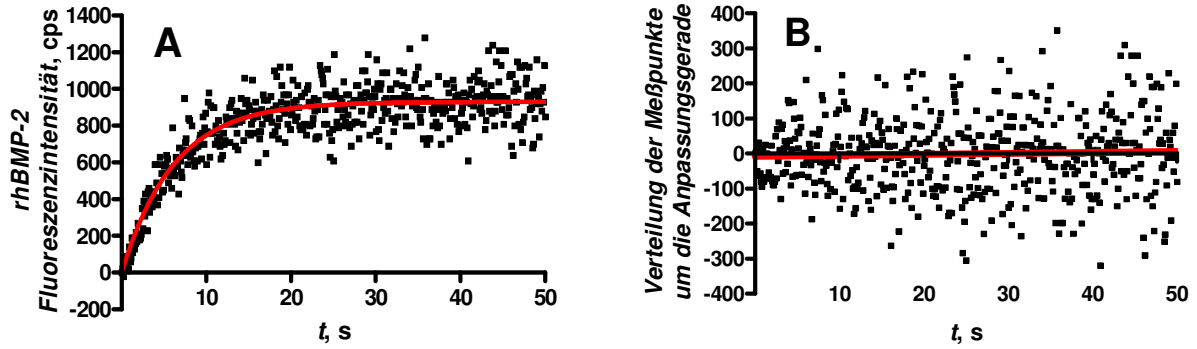


Abb. 30. Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion nach Auswahl des Initialpunktes $t = 37,4$ aus **Abb. 29**. **A:** Adsorptionskinetik mit einfacher exponentieller Anpassung (rote Kurve). $k_{obs} = 0,1625 \pm 0,0060 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,27 \pm 0,16 \text{ s}$), $r^2 = 0,779$. $\bar{x} \pm S.E.$ **B:** Residual Plot mit $P = 0,911$. Weitere Bedingungen siehe **Abb. 28**.

Zu sehen ist in **Abb. 30 A** eine erste Anpassung. Als Initialpunkt für die Anpassung wurde aus **Abb. 29** $t = 37,4 \text{ s}$ gewählt und in den Ursprung gesetzt. Die exponentielle Anpassung (rote Kurve in **Abb. 30 A**) lieferte einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,779$. Es wurde eine Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 0,1625 \pm 0,0060 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,27 \pm 0,16 \text{ s}$) berechnet. In **Abb. 30 B** ist der zugehörige Residual Plot abgebildet ($P = 0,911$). Zu erkennen ist dort, daß bis $t = 3 \text{ s}$ die Meßpunkte mehrheitlich unterhalb der roten Linie liegen. Mit $t = 37,4 \text{ s}$ liegt ein zu früh ausgewählter Initialpunkt vor.

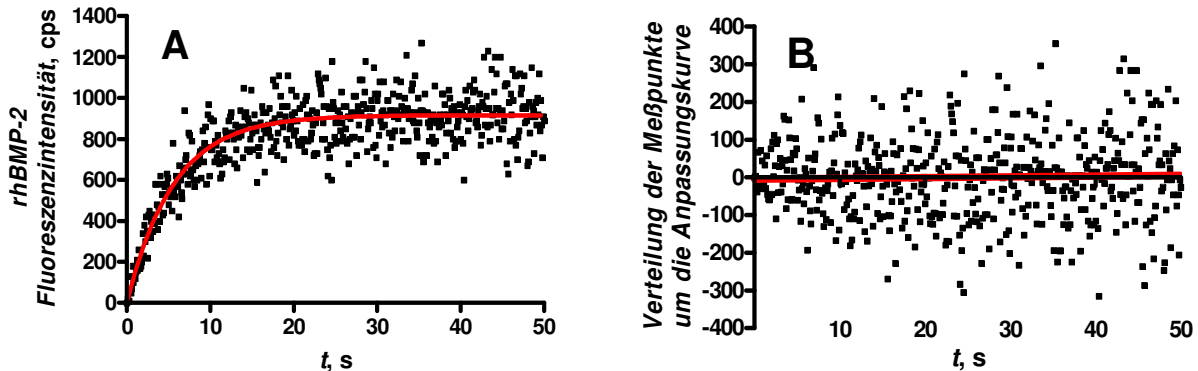


Abb. 31. Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion nach Auswahl des Initialpunktes $t = 37,9$ aus **Abb. 29**. **A:** Adsorptionskinetik mit einfacher exponentieller Anpassung (rote Kurve). $k_{obs} = 0,1782 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,89 \pm 0,15 \text{ s}$), $r^2 = 0,749$. $\bar{x} \pm S.E.$ **B:** Residual Plot mit $P = 0,956$. Weitere Bedingungen siehe **Abb. 28**.

Eine weitere Anpassung ist in **Abb. 31 A** dargestellt. Für die Anpassung wurde $t = 37,9 \text{ s}$ als Initialpunkt aus dem Übergangsbereich in **Abb. 29** gewählt und in den Ursprung gesetzt. Die rote Kurve in **Abb. 31 A** zeigt die Anpassung an eine exponentielle Funktion ($r^2 = 0,749$). Der Residual Runs Test ($P = 0,956$) ergibt eine gleichmäßige Verteilung der Meßpunkte um die

Residuallinie (rote Linie in **Abb. 31 B**). Aus der Anpassungskurve konnte die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 0,1782 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,89 \pm 0,15 \text{ s}$) berechnet werden.

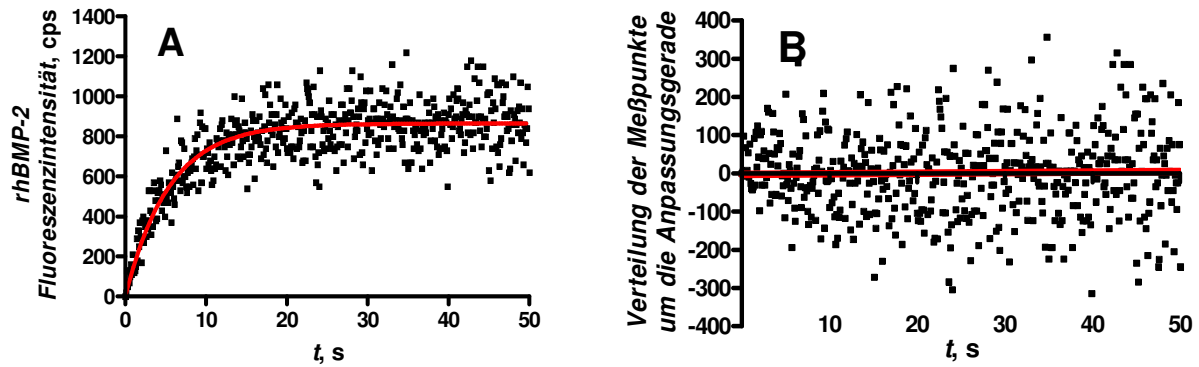


Abb. 32. Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion nach Auswahl des Initialpunktes $t = 38,4$ aus **Abb. 29**. **A:** Adsorptionskinetik mit einfacher exponentieller Anpassung (rote Kurve). $k_{obs} = 0,1850 \pm 0,0077 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,75 \pm 0,15 \text{ s}$), $r^2 = 0,708$. $\bar{x} \pm S.E.$ **B:** Residual Plot mit $P = 0,739$. Weitere Bedingungen siehe **Abb. 28**.

In **Abb. 32 A** ist eine Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion zu sehen (rote Kurve), der zu dem schlechtesten (siehe **Tab. 7**) Korrelationskoeffizienten $r^2 = 0,708$ führt. Als Initialpunkt wurde aus **Abb. 29** $t = 38,4 \text{ s}$ ausgewählt. Der Residual Runs Test (**Abb. 32 B**) ergab einen Residualwert von $P = 0,739$. Hier liegen die Meßpunkte in den ersten 4 s überwiegend oberhalb der Regressionsgeraden (rote Linie). In der folgenden Tabelle sind die statistischen und kinetischen Daten für Anpassungen mit allen in **Abb. 29** im Übergangsbereich dargestellten Meßpunkten (farbige Punkte) zusammengefaßt.

Tab. 7. Kinetische und statistische Daten aus Anpassungen an einfache exponentielle Funktionen bei Anwendung verschiedener Initialpunkte.*

Anpassung	Initialpunkt (s)	k_{obs} (s ⁻¹)	r^2	P	N_a (cps)
(●) Abb. 30	37,4	$0,1625 \pm 0,0060$	0,779	0,911	930
(●)	37,5	$0,1614 \pm 0,0061$	0,773	0,925	911
(●)	37,6	$0,1736 \pm 0,0064$	0,768	0,936	948
(●)	37,7	$0,1598 \pm 0,0063$	0,759	0,674	871
(●)	37,8	$0,1564 \pm 0,0064$	0,752	0,608	841
(●) Abb. 31	37,9	$0,1782 \pm 0,0068$	0,749	0,956	916
(●)	38,0	$0,1773 \pm 0,0070$	0,742	0,936	896
(●)	38,1	$0,1836 \pm 0,0072$	0,734	0,839	904
(●)	38,2	$0,1872 \pm 0,0074$	0,724	0,647	904
(●)	38,3	$0,1606 \pm 0,0070$	0,718	0,763	790
(●) Abb. 32	38,4	$0,1850 \pm 0,0077$	0,708	0,739	864

* Die Punkte in der Tabelle entsprechen in der Farbgebung den Meßpunkten in **Abb. 29** im Übergangsbereich. Blaue Punkte: Anpassungen ohne Abbildung. Grüne Punkte: Initialpunkt $t = 37,4$ s (**Abb. 30**) und $t = 38,4$ s (**Abb. 32**). Roter Punkt: Initialpunkt $t = 37,9$ s (**Abb. 31**). Weitere Bedingungen, siehe **Abb. 28**. $\bar{x} \pm S.E.$

Als absoluter Initialpunkt wurde derjenige Meßwert ausgewählt, mit welchem die Anpassung an eine exponentielle Funktion den höchsten Residualwert liefert. Für den Initialpunkt bei $t = 37,9$ s konnte die beste Anpassung gefunden werden, welche einen Residualwert von $P = 0,956$ ergibt (siehe **Tab. 7**). Dieser Punkt ist in **Tab. 7** und in **Abb. 29** rot dargestellt. Die Korrelationskoeffizienten nehmen mit größer werdendem Initialpunkt ab, da das Signal-Rausch-Verhältnis immer ungünstiger wird. Für die Residualwerte konnten derartige Zusammenhänge nicht abgeleitet werden.

4.1.3 Transportlimitierte Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas

Bei der Einleitung von Proteinlösungen ohne vorangehende Luftblase verläuft die Adsorption von Proteinmolekülen transportlimitiert, da die Proteinmoleküle durch die Nernstsche Diffusionsschicht diffundieren müssen.

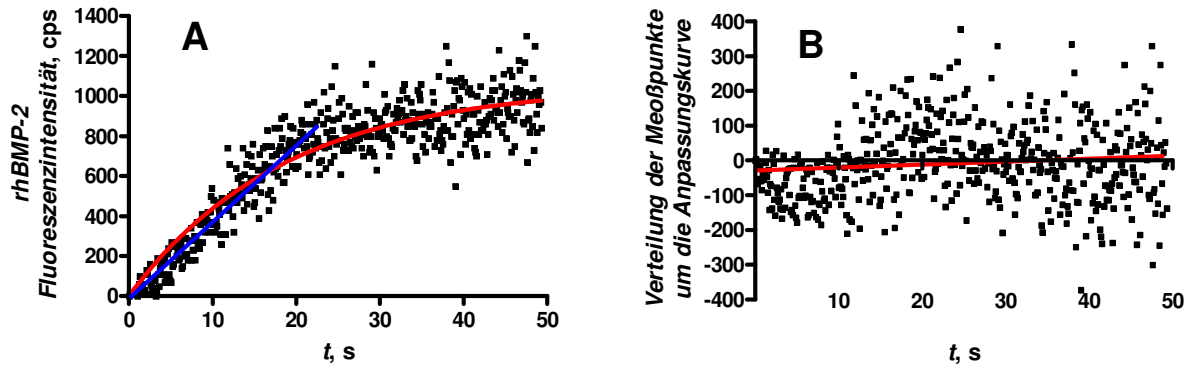


Abb. 33. Transportlimitierte Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas. **A:** Einleitung der Proteinlösung ($c = 3,45 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc , $\text{pH} = 4,5$) ohne Luftblase. Für die Kinetik wurden je Sekunde 10 Meßwerte aufgenommen. Rote Kurve: erfolglose exponentielle Anpassung ($r^2 = 0,872$). Daraus folgt die apparente konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}}^{\text{app}} = 0,0538 \pm 0,0024 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 12,9 \pm 0,6 \text{ s}$), die die Transportlimitierung enthält. $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ Blaue Linie: Transportlimitierter Anteil der Kinetik. Massentransportgeschwindigkeitskonstante: $k_{\text{tr}} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$ (berechnet mit Gl. 80 und Gl. 81). **B:** Residualplot mit Residuals Runs Test (rote Linie) mit $P = 0,046$. Durchflußrate: $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$, Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$. Das Grundrauschen (N_0) wurde subtrahiert.

In **Abb. 33** ist die Zunahme der Fluoreszenz als Funktion der Zeit dargestellt. In die Meßzelle wurde eine rhBMP-2-Lösung ($c = 3,45 \mu\text{mol/l}$) ohne vorangehende Luftblase eingeleitet. In den ersten 15 s findet man eine transportlimitierte Reaktion (blaue Gerade). Nach dem linearen Verlauf, innerhalb dessen bereits 80 % der Fluoreszenz der Endbeladung erreicht wurden, schließt sich der Übergang in einen exponentiellen Verlauf an, der reaktionslimitiert ist. In [42] wurden bei der Einleitung von Proteinlösungen (dort Fibrinogen) sigmoide Fluoreszenzverläufe gefunden, siehe auch **Abb. 14**. Wahrscheinlich ist, daß auch in **Abb. 33 A** die Fluoreszenzzunahme einem sigmoiden Verlauf folgt, doch ist das aus der Abbildung nicht erkennbar. Die Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion (rote Kurve in **Abb. 33 A**, $r^2 = 0,872$) zeigt, daß in den ersten 10 s die Meßpunkte fast vollständig unterhalb der Anpassungskurve liegen. Der Residual Runs Test (**Abb. 33 B**) bestätigt diese schlechte Anpassung mit einem Residualwert von $P = 0,046$. Innerhalb der ersten 10 s liegen fast alle Meßpunkte unterhalb der roten Regressionsgeraden, womit der transportlimitierte Lévêque-Fall vorliegt. Bei einer Transportlimitierung liegen die Meßpunkte unterhalb der Residuallinie des Residual Runs Testes. Mit Einsetzen der Reaktionslimitierung liegen die Meßpunkte dann gleichmäßig um die Residuallinie verteilt (**Abb. 33 B**).

Aus der schlechten exponentiellen Anpassung (rote Kurve in **Abb. 33 A**) ergibt sich eine Geschwindigkeitskonstante, die die Transportlimitierung beinhaltet und deswegen als apparente konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante bezeichnet wird, siehe auch Gl. 63 [13,22]. Ihr Wert ist $k_{obs}^{app} = 0,0538 \pm 0,0024 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 12,9 \pm 0,6 \text{ s}$). Aus der Steigung des linearen Anteils der Kinetik (blaue Gerade in **Abb. 33 A**) ergibt sich mit Gl. 81 [22] die Massentransportgeschwindigkeitskonstante $k_{tr} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ m/s}$. Durch eine sigmode Anpassung nach Boltzmann konnten Lagphase (in **Abb. 33** und **34** nicht sichtbar), Transportlimitierung und Reaktionslimitierung berücksichtigt werden.

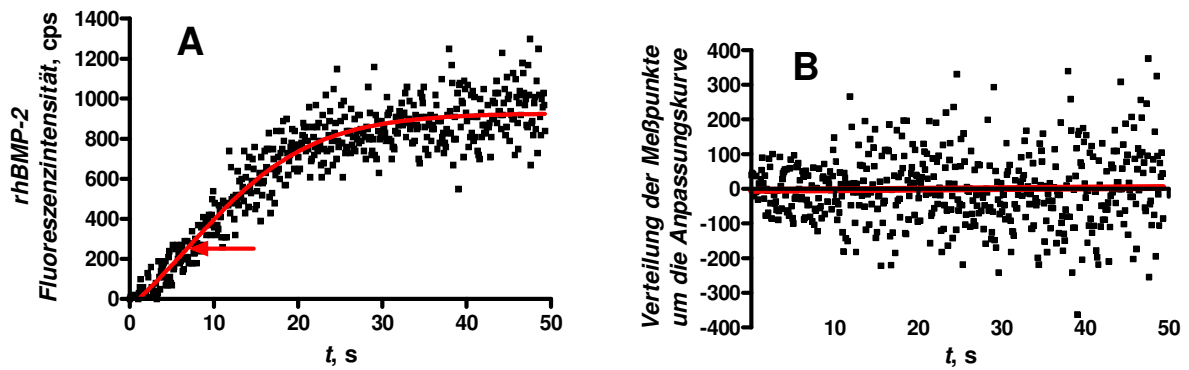


Abb. 34. Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas (ohne vorangehende Luftblase) mit Anpassung an sigmoidaler Funktion nach Boltzmann. **A:** Fluoreszenzverlauf aus **Abb. 33 A:** Anpassung an sigmoidaler Funktion nach Boltzmann (rote Kurve, $r^2 = 0,888$). Der Pfeil weist auf den Wendepunkt bei $t = 6,92 \pm 1,64 \text{ s}$ hin. Die exponentielle Anpassung mit dem Wendepunkt als Initialpunkt ergibt $k_{obs*} = 0,1024 \pm 0,0051 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 6,77 \pm 0,33 \text{ s}$). $\bar{x} \pm S.E.$ **B:** Residualplot mit Residuallinie (rote Linie) mit $P = 0,350$.

In **Abb. 34 A** wurde der Fluoreszenzverlauf aus **Abb. 33 A** an eine sigmoidale Funktion nach Boltzmann angepaßt, um den Wendepunkt zu bestimmen. Die rot gezeichnete Anpassungskurve besitzt einen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,888$. Der Pfeil weist auf den Wendepunkt bei $t = 6,92 \pm 1,64 \text{ s}$ hin. Die Verwendung des Wendepunktes als Initialpunkt (Index *) führt nach einer exponentiellen Anpassung (nicht abgebildet) zur konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs*} = 0,1024 \pm 0,0051 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 6,77 \pm 0,33 \text{ s}$). Die Anpassung ist zwar sehr gut ($P = 0,713$, $r^2 = 0,744$), doch führt sie zu einem Absinken der maximalen Fluoreszenz des adsorbierten Proteins von 929 cps auf 761 cps. In **Abb. 34 B** ist der Residualplot für die sigmoide Anpassung nach Boltzmann abgebildet. Aus ihm konnte der Residualwert $P = 0,350$ entnommen werden.

4.2 Adsorption von Proteinen an unterschiedlichen Oberflächen

Um einen Überblick über das Adsorptionsverhalten von rhBMP-2 an unterschiedlichen Oberflächen zu erhalten, wurde es an nativem Quarzglas, an Quarzglas, welches mit (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APS), Trichlorhexylsilan (THS) und Poly-DL-laktid (PDLA) behandelt wurde, und an Multilayern, bestehend aus wechselnden Schichten von Polyglutamat (PGA) und Poly-L-lysin (PLL), gebunden. Da das Protein rhBMP-2 an seiner Oberfläche hydrophile und hydrophobe Areale besitzt [95], lag es nahe, die verwendeten Substratoberflächen nach ihren Randwinkeln (**Kap. 2.10** und **3.3.5.1**) zu charakterisieren. Die hypothetischen Oberflächenstrukturen und Randwinkel sind in **Tab. 3** abgebildet. Für die Adsorptionsexperimente wurde die rhBMP-2-Lösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) mit einer vorangehenden Luftblase eingeleitet. Weitere Versuchsbedingungen, siehe **Kap. 3.3.8.2** und **3.3.8.4**.

4.2.1 Adsorption von rhBMP-2 an nativem Quarzglas

In **Abb. 35** ist eine Adsorptionskinetik von rhBMP-2 an nativem (**Kap. 3.3.4.1**), ultrahydrophilem Quarzglas (**Tab. 3**) dargestellt. Die Quarzglasoberfläche besaß einen Randwinkel von ($\theta_{adv} = 0 \pm 0^\circ$).

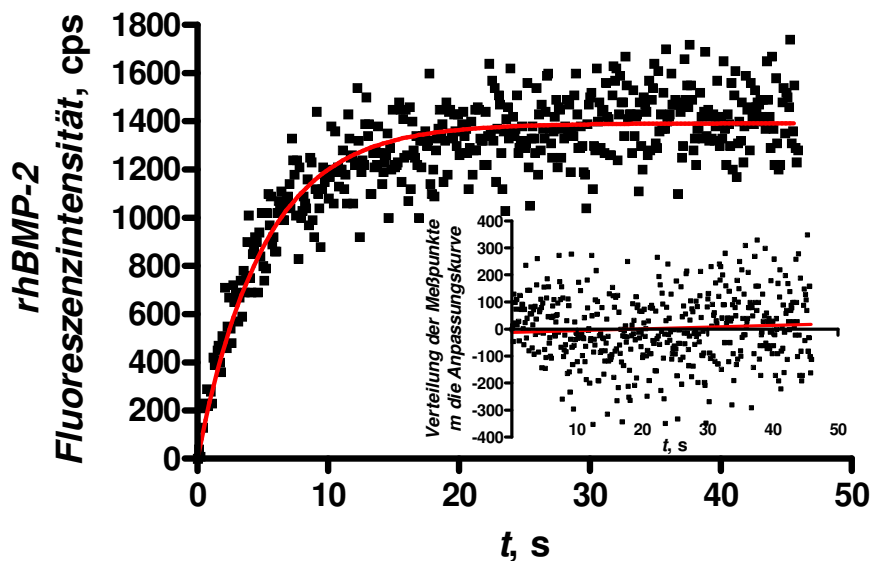


Abb. 35. Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem, nativem Quarzglas ($\theta_{adv} = 0 \pm 0^\circ$). Rote Kurve: Anpassung an einfache exponentielle Funktion ($r^2 = 0,825$, $P = 0,194$). $k_{obs} = 0,1981 \pm 0,0061 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,50 \pm 0,11 \text{ s}$). Einleitung der Proteinlösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc , $\text{pH} = 4,5$) mit vorangehender Luftblase ($70 \mu\text{l}$). Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Durchflußrate: $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$. $\lambda_{ex} = 285 \text{ nm}$ und $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$. Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. $\bar{x} \pm S.E.$

Die rote Kurve stellt die Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion dar ($r^2 = 0,825$). Der Residual-Runs-Test ergibt einen Residualwert von $P = 0,194$. Es wurde eine konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 0,1981 \pm 0,0061 \text{ s}^{-1}$ bei einer Adsorptionshalbwertszeit von ($t_{1/2} = 3,50 \pm 0,11 \text{ s}$) gefunden. Nach 20 s wurde im Adsorptionsgleichgewicht die maximale Fluoreszenz von $N_a = 1391 \pm 8 \text{ cps}$ gemessen. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse von fünf Einzelexperimenten mit ihren Standardabweichungen zusammengetragen.

Tab. 8. k_{obs} -Werte und Fluoreszenzen im Adsorptionsgleichgewicht bei der Adsorption von rhBMP-2 ($c = 3,85 \text{ } \mu\text{mol/l}$) auf nativem Quarzglas.*

Experiment	$k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$N_a \text{ (cps)}$
1	$0,2182 \pm 0,0076$	1348 ± 10
2	$0,1841 \pm 0,0062$	1688 ± 14
3	$0,1860 \pm 0,0077$	1744 ± 18
4 (Abb. 35)	$0,1981 \pm 0,0061$	1391 ± 8
5	$0,1908 \pm 0,0063$	1221 ± 7
Mittelwert	$0,1954 \pm 0,0067$	1478 ± 11

Fehler der Einzelwerte: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler der Mittelwerte: $\bar{x} \pm x_G \text{ (} n = 5 \text{)}$.

Zu sehen ist in **Tab. 8**, daß die relative Standardabweichung der gemittelten Einzelexperimente für die k_{obs} -Werte bei 3 % und für die Fluoreszenzen im Adsorptionsgleichgewicht bei 1 % liegt. Die Einzelexperimente besitzen eine Streuung von etwa 17 % bei den k_{obs} -Werten und etwa 36 % bei den Fluoreszenzen.

4.2.2 Adsorption von rhBMP-2 an (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APS)

Eine Adsorption von rhBMP-2 ($c = 3,85 \text{ } \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas, an welches APS kovalent gebunden wurde (**Tab. 3**), ist in **Abb. 36** zu sehen. Die Oberfläche besitzt einen Randwinkel von $\theta_{adv} = 52 \pm 2^\circ$. Nach etwa 25 s wurde im Adsorptionsgleichgewicht eine maximale Fluoreszenz von $N_a = 578 \pm 6 \text{ cps}$ gemessen. Die Adsorptionskinetik konnte an eine einfache exponentielle Funktion angepaßt werden ($r^2 = 0,641$), siehe rote Kurve in **Abb. 36**. Der Residuals-Runs-Test ergab einen Residualwert von $P = 0,674$. Es wurde die konzentrations-

abhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs} = 0,1401 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$ bei einer Adsorptionshalbwertszeit von $t_{1/2} = 4,95 \pm 0,24 \text{ s}$ gefunden. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt.

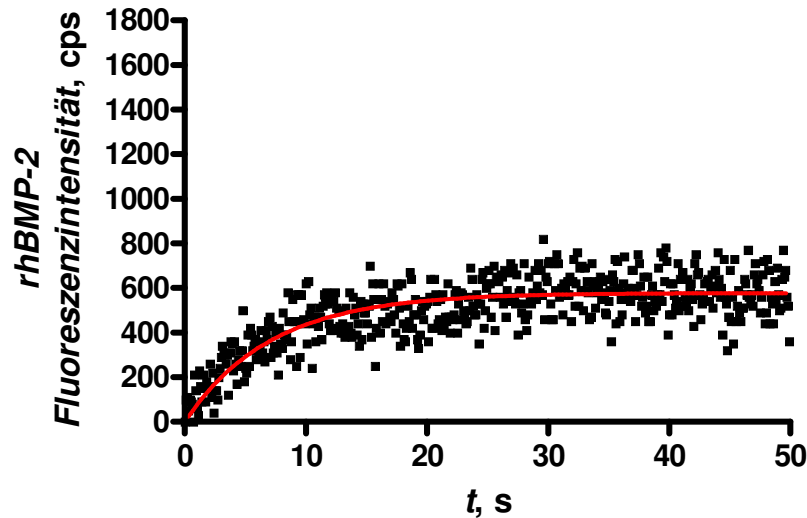


Abb. 36. Adsorption von rhBMP-2 an mit APS behandeltem Quarzglas ($\theta_{adv} = 52 \pm 2^\circ$). Rote Kurve: Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion $k_{obs} = 0,1401 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,95 \pm 0,24 \text{ s}$). $P = 0,674$, $r^2 = 0,641$. Die rhBMP-2-Lösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc , $\text{pH} = 4,5$) wurde mit einer vorangehenden Luftblase eingeleitet. Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Weitere Versuchsbedingungen, siehe **Abb. 35**. $\bar{x} \pm S.E.$

4.2.3 Adsorption von rhBMP-2 an Trichlorhexylsilan (THS)

Eine Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobe Hexylgruppen ist in **Abb. 37** dargestellt. Die Oberfläche (**Tab. 3**) war stark hydrophob und besaß einen Randwinkel von $\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$. Die rote Linie stellt die Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion dar ($P = 0,923$, $r^2 = 0,685$).

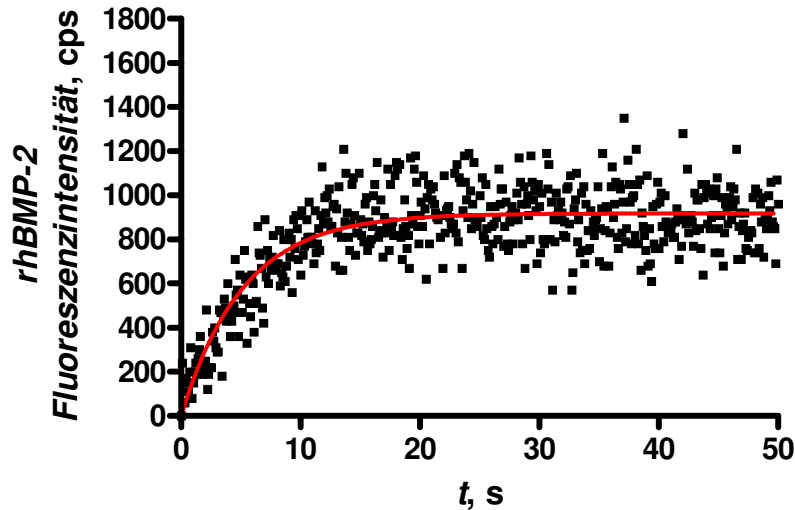


Abb. 37. Adsorption von rhBMP-2 an mit Trichlorhexylsilan (THS) behandeltem Quarzglas ($\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$). Die Oberfläche ist stark hydrophob. Die rote Kurve stellt die Anpassung an eine exponentielle Funktion dar. $k_{obs} = 0,1924 \pm 0,0087 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,60 \pm 0,16 \text{ s}$). $P = 0,923$. $r^2 = 0,685$. Die rhBMP-2-Lösung mit ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc , $\text{pH} = 4,5$) wurde mit einer Luftblase in die Meßzelle eingeleitet. Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Weitere Versuchsbedingungen, siehe **Abb. 35**. $\bar{x} \pm S.E.$

Aus der Kinetik konnte die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{obs} = 0,1924 \pm 0,0087 \text{ s}^{-1}$ entnommen werden. Die Adsorptionshalbwertszeit betrug $t_{1/2} = 3,60 \pm 0,16 \text{ s}$. Nach etwa 20 s wurde die maximale Fluoreszenz $N_a = 917 \pm 7 \text{ cps}$ gemessen. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt.

4.2.4 Adsorption von rhBMP-2 an Poly-DL-laktid (PDLLA)

Eine Adsorption von rhBMP-2 an eine mit PDLLA beschichtete Quarzglasplatte (**Tab. 3**) ist in **Abb. 38** dargestellt. Die Oberfläche ist hydrophob ($\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$). Die Adsorptionskinetik ist an eine einfache exponentielle Funktion anpaßbar ($r^2 = 0,845$, rote Linie). Aus dem Residual Runs Test ergibt sich der Residualwert $P = 0,153$. Nach ca. 20 s wurde die maximale Fluoreszenz von $N_a = 1456 \pm 7 \text{ cps}$ für das Adsorptionsgleichgewicht gemessen. Die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante ist $k_{obs} = 0,2010 \pm 0,0056 \text{ s}^{-1}$. Die Adsorptionshalbwertszeit beträgt $t_{1/2} = 3,45 \pm 0,10 \text{ s}$. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt.

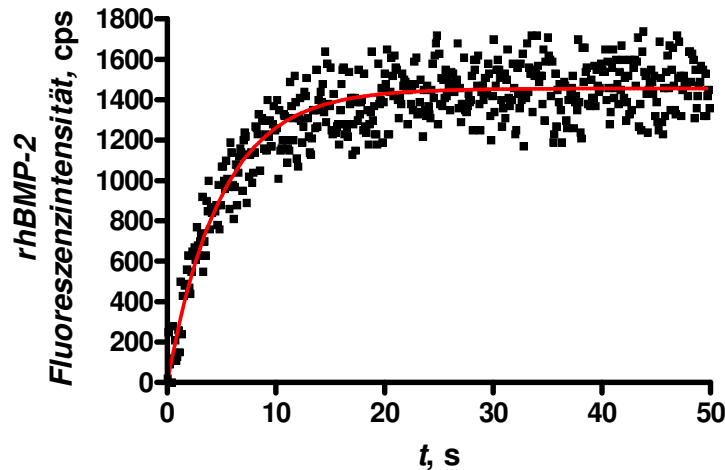


Abb. 38. Adsorption von rhBMP-2 an mit Poly-DL-lakid (PDLLA) beschichtetem Quarzglas ($\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$). Die rhBMP-2-Lösung mit ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc, $\text{pH} = 4,5$) wurde mit einer Luftblase eingeleitet. Die rote Kurve stellt die Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion dar ($P = 0,153$, $r^2 = 0,845$). $k_{obs} = 0,2010 \pm 0,0056 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,45 \pm 0,10 \text{ s}$). Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Weitere Versuchsbedingungen, siehe Abb. 35. $\bar{x} \pm S.E.$

4.2.5 Adsorption von rhBMP-2 an Polyelektrolytmultilayern (PEMs) bestehend aus wechselnden Schichten von Polyglutamat (PGA) und Poly-L-lysin (PLL)

Bisher wurden in Abb. 35 bis 38 Kinetiken vorgestellt, die die Adsorption von rhBMP-2 ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) an einlagige Schichten beschreiben. Im Gegensatz dazu zeigt Abb. 39 die Adsorption von rhBMP-2 an Mehrfachschichten (Multilayer), die abwechselnd aus PGA und PLL (Tab. 3) aufgebaut wurden und aus 20 übereinanderliegenden Einzelschichten bestehen. Die Randwinkel von 33° bis 63° wurden nicht gemessen, sondern für eine ähnlich aufgebaute Schicht, bestehend aus Chondroitinsulfat und PLL, aus [229] entnommen. Die Beschichtung rechtwinkliger Quarzglasplatten, wie sie für die Randwinkelmessung nach der Wilhelmy-Plate-Methode erforderlich sind, konnte mit dem Spincoating-Verfahren aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden in den folgenden beiden Adsorptionsexperimenten nicht berücksichtigt.

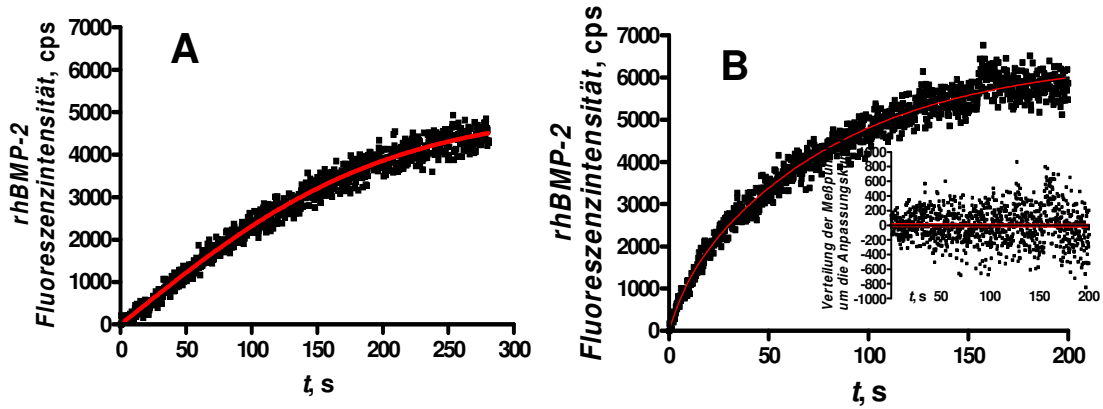


Abb. 39. Adsorption von rhBMP-2 an Mehrfachsichten. Die Mehrfachsichten, bestehend aus 20 Einzelschichten, sind im Wechsel aus PGA und PLL aufgebaut. Die Adsorptionen erfolgten aus einer rhBMP-2-Lösung mit $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$, gelöst in 20 mM NaAc ($\text{pH} = 4,5$). Weitere Versuchsbedingungen siehe Abb. 35. **A:** Einleitung der rhBMP-2-Lösung ohne Luftblase. Anpassung an eine Exponentialfunktion nicht möglich. Rote Kurve zeigt die Anpassung an eine sigmoidale Funktion nach Boltzmann ($P = 0,070$, $r^2 = 0,983$). **B:** Einleitung der Proteinlösung mit Luftblase. Rote Kurve: zweifache exponentielle Anpassung ($r^2 = 0,974$). Die insertierte Graphik zeigt den Residualplot mit $P = 0,317$. $k_{\text{obs,A}} = 0,1174 \pm 0,0242 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 5,90 \pm 1,42 \text{ s}$) und $k_{\text{obs,B}} = 0,0122 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 56,8 \pm 2,1 \text{ s}$). Fluoreszenzen im Adsorptionsgleichgewicht: $N_{a,A} = 766 \pm 101 \text{ cps}$ (12%) für den schnellen und $N_{a,B} = 5729 \pm 63 \text{ cps}$ (88%) für den langsamen Adsorptionsanteil. Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. $\bar{x} \pm S.E.$

Die Einleitung der rhBMP-Lösung ohne vorangehende Luftblase bewirkt, daß selbst nach 280 s nicht die maximale Fluoreszenz erreicht wird (Abb. 39 A). Die Anpassung an eine exponentielle Funktion ist nicht möglich. Die rot dargestellte Kurve zeigt eine Anpassung an eine sigmoidale Funktion nach Boltzmann ($P = 0,070$, $r^2 = 0,983$). Die maximale Fluoreszenz liegt bei $N_{\text{max}} = 5110 \text{ cps}$ und darf nicht als Fluoreszenz im Adsorptionsgleichgewicht fehlinterpretiert werden. Die Berechnung einer apparenten Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante wie in Kap. 4.1.3 für die Kinetik in Abb. 33 ist nicht möglich, da dort die maximale Fluoreszenz graphisch ermittelt werden konnte. In Abb. 39 B ist eine Adsorptionskinetik zu sehen, bei der die Einleitung der rhBMP-2-Lösung mit einer Luftblase erfolgte. Die Kinetik wurde an eine zweifache exponentielle Funktion angepaßt ($r^2 = 0,974$). Entsprechend folgen hieraus zwei konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten, nämlich $k_{\text{obs,A}} = 0,1174 \pm 0,0242 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 5,90 \pm 1,42 \text{ s}$) und $k_{\text{obs,B}} = 0,0122 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 56,8 \pm 2,1 \text{ s}$). Der Residual Runs Test ($P = 0,317$) für die zweifache exponentielle Anpassung ist in Abb. 39 B insertiert dargestellt. Der schnell verlaufende Adsorptionsanteil umfaßt 12 %

($N_a = 766 \pm 101$ cps) und der langsam verlaufende Adsorptionsanteil 88 % ($N_a = 5729 \pm 63$ cps) der im Adsorptionsgleichgewicht gemessenen Fluoreszenz.

4.2.6 Zusammenfassende Übersicht zu den Adsorptionsexperimenten

In der folgenden Tabelle sind die aus den Adsorptionsexperimenten in **Abb. 35** bis **39** (Einleitung mit einer Luftblase, exponentiell anpaßbar) erhaltenen konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten und die Randwinkel zusammengestellt.

Tab. 9. Übersicht der konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten (k_{obs} -Werte) für die Adsorption von rhBMP-2 an unterschiedlichen Oberflächen.*

Adsorption	Randwinkel	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante k_{obs} , s ⁻¹	Fluoreszenz im Adsorptionsgleichgewicht N_a , cps
rhBMP-2 an Quarz (Abb. 35)	0° ± 0°	0,1981 ± 0,0061	1391 ± 8
rhBMP-2 an APS (Abb. 36)	52° ± 2°	0,1401 ± 0,0068	578 ± 6
rhBMP-2 an THS (Abb. 37)	104° ± 2°	0,1924 ± 0,0087	917 ± 7
rhBMP-2 an PDLA (Abb. 38)	82° ± 2°	0,2010 ± 0,0056	1 456 ± 7
rhBMP-2 an PLL/PGA (Abb. 39)	33° bis 63° **	0,1174 ± 0,0242	766 ± 101
		0,0122 ± 0,0005	5729 ± 63

* Zur hypothetischen Oberflächenstruktur, siehe **Tab. 3**. Die rhBMP-2-Konzentration betrug bei allen Experimenten $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$. Alle Proteinlösungen wurden mit einer Luftblase in die Meßzelle eingeleitet. Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. ** Siehe **Kap. 4.2.5** und [229]. Fehler der Randwinkel: $\bar{x} \pm x_G$ ($n = 4375$, siehe **Kap. 3.3.5.1**). Fehler der k_{obs} - und N_a -Werte: $\bar{x} \pm S.E.$

Die konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten (k_{obs} -Werte) von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas, an stark hydrophobem THS und an hydrophobem PDLA sind gleich. Etwa 25 % kleiner ist der k_{obs} -Wert für die Adsorption von rhBMP-2 an APS. Bei der Adsorption von rhBMP-2 an Multilayern sind die k_{obs} -Werte deutlich kleiner (siehe **Tab. 9**). Unter der Annahme, daß das Streulicht bei allen Adsorptionsexperimenten gleich hoch ist, findet man auf den Multilayern (**Abb. 39**) eine etwa fünfmal so hohe Fluoreszenz wie auf nativem Quarzglas (**Abb. 35**), APS (**Abb. 36**), THS (**Abb. 37**) oder PDLA (**Abb. 38**). Daß die Annahme bezüglich annähernd gleicher Streuung zulässig ist, ergibt sich aus **Tab. 8**, dort wurden für unterschiedliche Experimente ähnliche Fluoreszenzen gefunden.

4.3 Photobleaching und Fluoreszenzquenching

Adsorptions- und Desorptionskinetiken, die aus Experimenten am TIRF-Rheometer erhalten werden, zeigen die Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Zeit. Die gemessenen Fluoreszenzen müssen korrigiert werden, da sie infolge von Photobleaching (photochemische Zerstörung) und Fluoreszenzquenching (Fluoreszenzauslöschung) verfälscht werden.

4.3.1 Photobleaching von rhBMP-2 bei Adsorptionen

Zur Überprüfung des Adsorptionsgleichgewichtes wurde das adsorbierte rhBMP-2 zunächst für 500 s in überstehender rhBMP-2-Lösung gleicher Konzentration und danach in Pufferlösung inkubiert, siehe **Kap. 3.3.8.5**. Die Inkubation in Pufferlösung wurde durchgeführt, um nicht adsorbierte rhBMP-2-Spezies von der Oberfläche zu entfernen. Während der Inkubation wurde mehrmals kurz belichtet um die Fluoreszenz zu messen, siehe Punkte A bis E in **Abb. 40**.

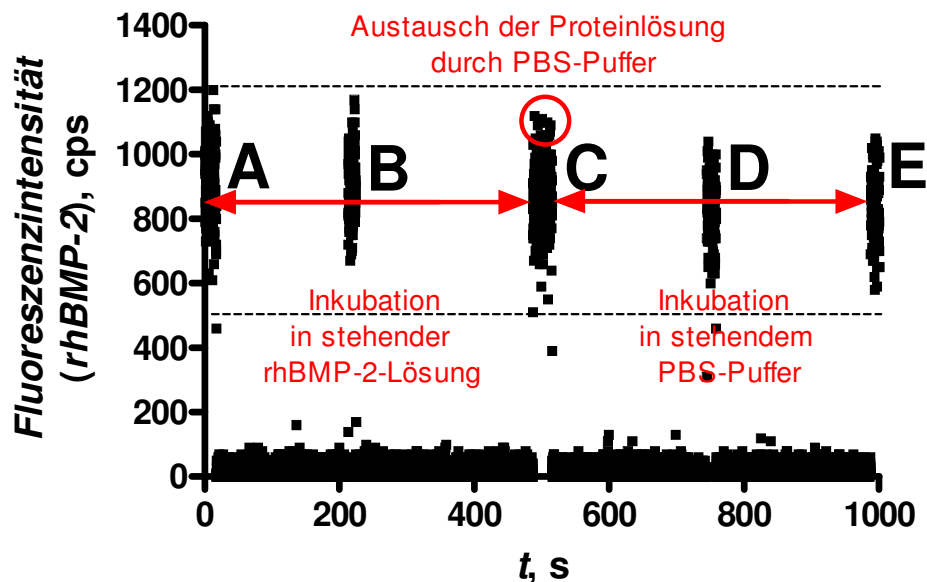


Abb. 40. Inkubation des adsorbierten rhBMP-2 in stehender rhBMP-2-Lösung mit anschließender Inkubation in stehendem PBS-Puffer. Die Inkubationen erfolgten nach Erreichen der Endbeladung. Bis $t = 500,0$ s: Inkubation in rhBMP-2 ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ in 20 mM NaAc, $\text{pH} = 4,5$). Von $t = 500,0$ bis 520 s: Durchleitung von PBS-Puffer (8 mM, $\text{pH} = 7,4$). Ab $t = 520,0$ s: Inkubation in PBS-Puffer. Während des Experimentes wurde fünfmal kurz belichtet (Signale zwischen den waagerechten Linien). Belichtungszeiten und gemessene Fluoreszenzen: A: 16,8 s (900 ± 103 cps), B: 11,4 s (896 ± 98 cps), C: 28,4 s Fluoreszenzabfall von 880 ± 101 cps auf 865 ± 94 cps durch Bufferflush (roter Kreis) innerhalb des Zeitraumes von etwa $t = 500$ bis 501,7 s, D: 13,5 s (839 ± 95 cps) und E: 12,8 s (838 ± 104 cps). Die Werte in Klammern sind die mittleren Fluoreszenzen mit Angabe des Fehlers als Standardabweichung ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$). Die Meßpunkte zwischen den waagerechten Linien wurden zur Mittelwertberechnung herangezogen. Die unteren Signale bis etwa 200 cps wurden bei geschlossener Blende gemessen. Die Inkubationen erfolgten ohne Durchfluß. $\lambda_{\text{ex}} = 285$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 350$ nm. Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$.

Die Gesamtdauer der UV-Belichtung betrug 82,9 s. Die Fluoreszenzen bis etwa 200 cps (untere waagerechte Linie in **Abb. 40**) wurden bei geschlossener Blende gemessen. Die Inkubationen erfolgten ohne Durchfluß um eine Fluoreszenzänderung durch desorbierende Moleküle zu vermeiden. Die angegebenen Fehler der gemittelten Fluoreszenzen sind Standardabweichungen; der dahinter stehende, geklammerte Wert in den folgenden Ausführungen ist die Anzahl der zur Mittelwertbildung verwendeten Einzelwerte. Die Mittelwertbildung (die relative Standardabweichung liegt bei 11 %) erfolgte aus den Meßpunkten innerhalb der gestrichelten, waagerechten Linien in **Abb. 40**.

In **Abb. 40** Punkt **A** beginnt die Inkubation mit rhBMP-2-Lösung bei $t = 0$ s. Dort wurde eine mittlere Fluoreszenz von $\bar{N}_a = 900 \pm 103$ cps (168) gemessen. Die Belichtungsdauer betrug 16,8 s. Ab $t = 212,4$ s wurde für 11,4 s erneut belichtet und eine mittlere Fluoreszenz von $\bar{N}_a = 896 \pm 98$ cps (116) gemessen (**Abb. 40** Punkt **B**). Bei $t = 500,0$ s trat die Pufferlösung in die Meßzelle ein und ersetzte die Proteinlösung (**Abb. 40** Punkt **C**). Der Bufferflush (Austausch der Proteinlösung durch die Pufferlösung) dauerte 1,7 s, wodurch die mittlere Fluoreszenz von $\bar{N}_a = 880 \pm 101$ cps (138) auf $\bar{N}_a = 865 \pm 94$ cps (129) absinkt. Die Fluoreszenzmessung (beginnend ab $t = 486,2$ s) dauerte 28,4 s. Bei $t = 520,0$ s wurde die Durchleitung des Puffers gestoppt, so daß ab hier die Inkubation in Puffer erfolgte. Bei $t = 744,1$ s erfolgte für 13,5 s eine weitere Fluoreszenzmessung (**Abb. 40** Punkt **D**), wobei eine mittlere Fluoreszenz von $\bar{N}_a = 839 \pm 95$ cps (135) gemessen wurde. Eine letzte Fluoreszenzmessung fand bei $t = 987,2$ s (**Abb. 40** Punkt **E**) für 12,8 s statt. Gemessen wurde dort eine mittlere Fluoreszenz von $\bar{N}_a = 838 \pm 104$ cps (129).

Sowohl zwischen Punkt **A** und Punkt **B** (beide in **Abb. 40**) als auch zwischen Punkt **D** und Punkt **E** (beide in **Abb. 40**) findet praktisch keine Fluoreszenzänderung statt. Dagegen sinkt die Fluoreszenz zwischen Punkt **B** und Punkt **D** (beide in **Abb. 40**) um $N_a = 57$ cps, beim Bufferflush (Punkt **C**) hingegen nur um $N_a = 15$ cps ab. Möglicherweise ist die Pufferlösung schon früher in die Meßzelle eingetreten, noch bevor die Fluoreszenzmessung (Punkt **C** in **Abb. 40**) gestartet wurde, weshalb beim Bufferflush ein geringerer Fluoreszenzabfall gemessen wurde. Die durch die Inkubationen hervorgerufene Fluoreszenzänderung von $N_a = 62$ cps ist nicht signifikant.

Das folgende Photobleachexperiment (**Abb. 41**) wurde in PBS-Puffer ohne Durchfluß und bei einer Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ durchgeführt. Während des gesamten Experimentes erfolgte

eine dauerhafte Bestrahlung mit UV-Licht. Zur Berücksichtigung des Fluoreszenzquenchings, siehe Kap. 4.3.3.

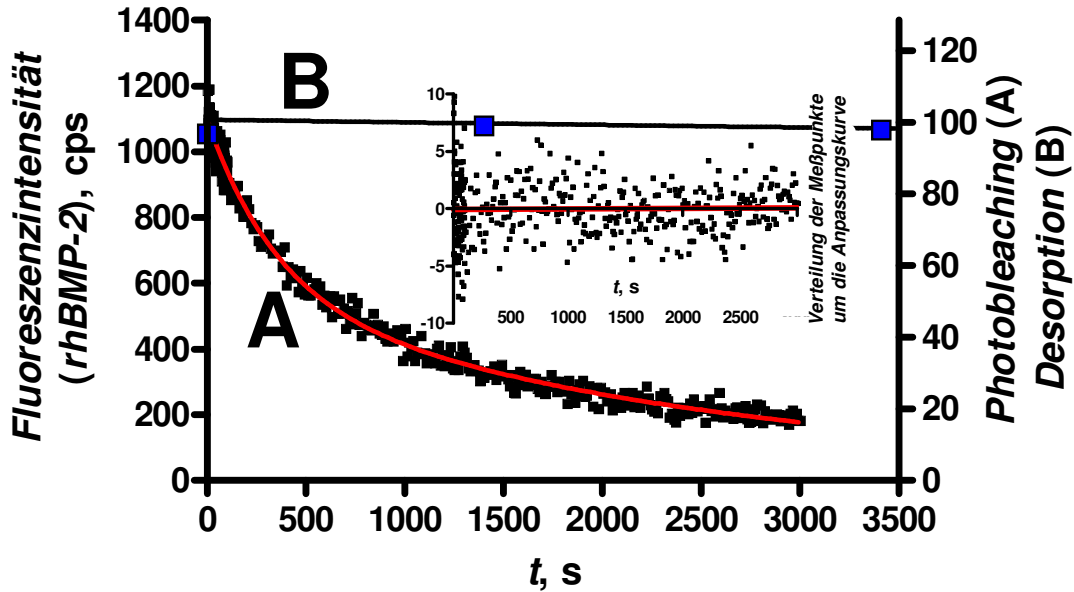


Abb. 41. Fluoreszenzverlust von adsorbiertem rhBMP-2 bei dauerhafter UV-Bestrahlung. **A:** Photobleaching von adsorbiertem Protein ($c = 3,84 \mu\text{mol/l}$). Anpassung an zweifach exponentieller Funktion (rote Anpassungskurve, $r^2 = 0,993$). Photobleachgeschwindigkeitskonstanten: $k_{-1}^p = 2,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,0 \pm 0,2 \text{ min}$) und $k_{-2}^p = 3,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 29,7 \pm 1,3 \text{ min}$). $\text{Span1} = 52 \%$ ($568 \pm 20 \text{ cps}$) und $\text{Span2} = 48 \%$ ($530 \pm 19 \text{ cps}$). Gesamtbelichtungsdauer 3000 s (kein Durchfluß). Linke Ordinate: Fluoreszenz in cps. Rechte Ordinate: Fluoreszenz in %. Die Insertierte Graphik zeigt den Residual-Plot mit dem Residualwert von $P = 0,780$. **B:** Desorptionsexperiment: Fluoreszenzabfall durch bei Desorption im Durchfluß mit $\dot{V} = 145 \text{ ml/h}$ (zur Berücksichtigung des Fluoreszenzquenchings, siehe Kap. 4.3.3). Gesamtbelichtungsdauer: 20 s. Belichtung erfolgte bei den blau gekennzeichneten Vierecken. Der Fluoreszenzabfall beträgt innerhalb von 50 min 1,8 %. Die rote Linie wurde der Anpassungskurve der Desorptionskinetik A in Abb. 48 entnommen. Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. $\bar{x} = S.E.$

Der Fluoreszenzabfall von adsorbierten rhBMP-2-Molekülen ($c = 3,84 \mu\text{mol/l}$) bei dauerhafter UV-Bestrahlung (3000 s) ist in Abb. 41 in der Kinetik A dargestellt. Innerhalb dieser Zeit ist die Fluoreszenz um 84,3 % abgefallen. Die linke Ordinate zeigt die Fluoreszenzintensität in der Einheit cps und die rechte in Prozenten. Die rote Kurve zeigt die Anpassung an eine zweifache exponentielle Funktion ($r^2 = 0,993$, $P = 0,780$). Hieraus konnten die beiden Photobleachgeschwindigkeitskonstanten $k_{-1}^p = 2,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,0 \pm 0,2 \text{ min}$) und $k_{-2}^p = 3,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 29,7 \pm 1,3 \text{ min}$) berechnet werden. Offenbar erfolgt die photochemische Zersetzung der Proteinmoleküle über zwei Reaktionen. Eine einfach exponentielle Anpassung (nicht abgebildet) führt zu einem Residualwert von $P < 0,0001$. Die Spanwerte betragen bei beiden Zerfällen etwa 50 %.

Da das Photobleachexperiment 50 min dauerte, wurde eine Kontrolle durchgeführt, um festzustellen, wie hoch der Fluoreszenzverlust durch die Desorption des Proteins ist. Das Desorptionsexperiment ist in **Abb. 41** Kinetik **B** zu sehen (Gesamtbelichtungsdauer 20 s, siehe blaue Punkte) und stellt die ersten 50 min der Desorptionskinetik **A** in **Abb. 48** als Ausschnitt dar. Innerhalb dieser Zeit verringerte sich die Fluoreszenz durch die Desorption um 1,8 % und wurde deshalb beim Photobleachexperiment vernachlässigt. In den ersten 50 min des Desorptionsexperimentes **B** in **Abb. 41** betrug die Belichtungsdauer insgesamt 20 s (blaue Punkte in Kinetik).

Wie beim Photobleachexperiment in **Abb. 41**, erfolgten auch die Adsorptionen unter Dauerbelichtung von bis zu 100 s. Ob ein signifikanter Einfluß durch Photobleaching bei der Adsorption vorliegt, wurde durch den Vergleich von korrigierten (Einfluß des Photobleachings herausgerechnet, siehe weiter unten) mit unkorrigierten Adsorptionskinetiken (experimentell ermittelten Adsorptionskinetiken) überprüft. Wegen der Limitierung bei der Datenerhebung durch das TIRF-Rheometer (es können maximal 5000 Datensätze erfaßt werden), wurde beim Photobleachexperiment je Sekunde nur ein Meßwert aufgenommen, so daß nach 50 min 3000 Wertepaare erhalten wurden. Bei 10 Meßvorgängen innerhalb einer Sekunde müßte die Dauer des Photobleachexperimentes (Kinetik **A** in **Abb. 41**) auf 500 s begrenzt werden. Bei den Adsorptionsexperimenten, die nach höchstens 100 s abgeschlossen waren, mußten je Sekunde 10 Meßwerte aufgezeichnet werden, um die Kinetik genau zu erfassen. Bei den Adsorptionsexperimenten (höchstens 1000 Meßwerte) wird das Limit bei der Datenerhebung nicht erreicht. Um eine punktgleiche Korrektur der Fluoreszenzverläufe aus den Adsorptionsexperimenten vorzunehmen, wurde nur jeder 10. Punkt der Adsorptionskinetik berücksichtigt. Beispiele für die punktgleiche Korrektur von Fluoreszenzverläufen sind in **Abb. 43** und **44** dargestellt. Die Korrektur der Fluoreszenzverläufe erfolgte in der Weise, daß aus **Abb. 41** jeder Datensatz für $t = 1, 2, 3$ u.s.w. aus der Anpassungskurve der Kinetik **B** durch den Datensatz aus der Anpassungskurve der Kinetik **A**, ebenfalls für $t = 1, 2, 3$ u.s.w., dividiert wurde. So ergibt sich für jeden Zeitpunkt für die gemessene Fluoreszenz ein spezifischer Quotient, mit welchem die Adsorptionskinetiken punktgenau korrigiert wurden. Die Anpassung des korrigierten Fluoreszenzverlaufes (ohne den Einfluß von Photobleaching) an eine exponentielle Funktion führt zur konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante k_{obs}^o , während aus der experimentellen Adsorptionskinetik (mit Einfluß des Photobleachings) k_{obs}^m erhalten wird. Die Division der k_{obs} -Werte führt zu einem Korrekturfaktor, der als Bleachkonstante

$$f_B = \frac{k_{obs}^o}{k_{obs}^m} \quad (97)$$

bezeichnet werden soll. k_{obs}^o und k_{obs}^m entstammen aus den Kinetiken, bei der nur jeder 10. Datensatz verwendet wurde. Mit den Bleachkonstanten wurden die k_{obs} -Werte multipliziert, die aus den experimentellen Adsorptionskinetiken (alle Datensätze) erhalten wurden. Die Auftragung der Bleachkonstanten gegen die entsprechenden Endbeladungen ist in **Abb. 42** dargestellt.

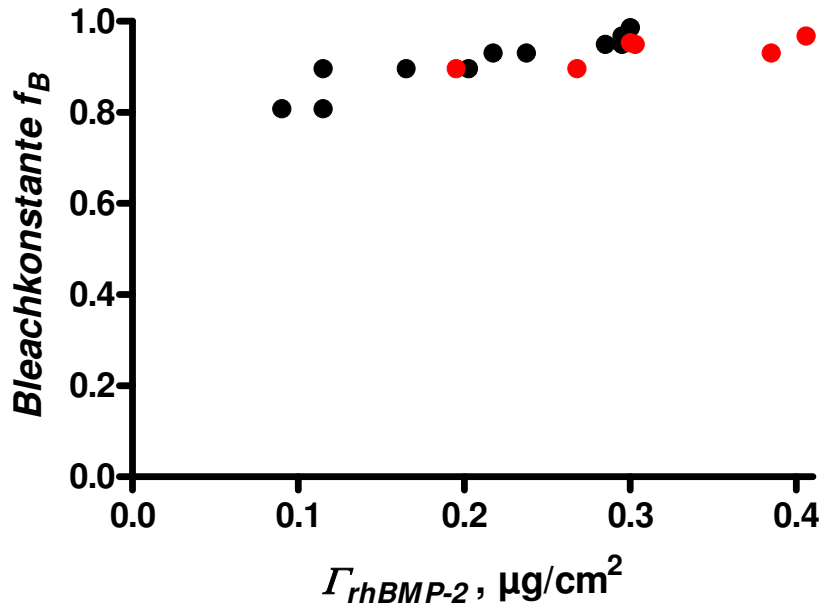


Abb. 42. Auftragung der Bleachkonstanten f_B gegen die rhBMP-2-Oberflächenkonzentrationen. Schwarze Punkte: Bleachkonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas. Rote Punkte: Bleachkonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an PDLA. Ab einer Oberflächenkonzentration von $\Gamma = 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ändern sich die Bleachkonstanten nur noch wenig. Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt.

In **Abb. 42** sind die Bleachkonstanten in Abhängigkeit von den maximalen Oberflächenkonzentrationen dargestellt. Schwarze Punkte zeigen die Bleachkonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas. Rote Punkte gelten für die Adsorption des Proteins an PDLA. Die Datensätze wurden nicht an mathematische Funktionen angepaßt, da im Bereich des starken Anstiegs keine Daten vorliegen ist. Der erste Datensatz liegt bei $f_B = 0,81$. Ab einer Oberflächenkonzentration von etwa $\Gamma = 0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (welche man bei Adsorptionen aus rhBMP-2-Lösungen mit einer Konzentration ab etwa $c = 1 \mu\text{mol}/\text{l}$ erhält) findet nur noch eine geringe Änderung der Bleachkonstanten statt. Die Bleachkonstanten nähern sich dem Endwert $f_B = 1$. Bei sehr hohen Konzentrationen wird die maximale Fluoreszenz erreicht bevor die Proteinmoleküle photochemisch zerstört werden (siehe **Abb. 44**). Bei

der Adsorption von rhBMP-2 an PDLA wurden nur Proteinlösungen mit Konzentrationen ab $c = 1,92 \mu\text{mol/l}$ untersucht. Die Änderung der Bleachkonstanten ist deswegen sehr gering. Für die Adsorptionsexperimente von rhBMP-2 an Quarzglas bzw. PDLA finden sich die Bleachkonstanten in **Tab. 16** und **19**.

4.3.2 Oberer und unterer Grenzbereich des Photobleachings bei Adsorptionen

Die niedrigste rhBMP-2-Konzentration, die für Adsorptionsexperimente eingesetzt wurde, betrug $c = 0,385 \mu\text{mol/l}$. Die maximale Fluoreszenz lag nach 100 s vor (**Abb. 43**). Im Verlauf der Adsorption wurden 1000 Meßpunkte aufgezeichnet. Hiervon wurden 100 Meßpunkte statistisch ausgewählt (jeder 10. Meßpunkt) und durch eine Einzelpunktkorrektur (**Abb. 41**) der Einfluß des Photobleachings herausgerechnet.

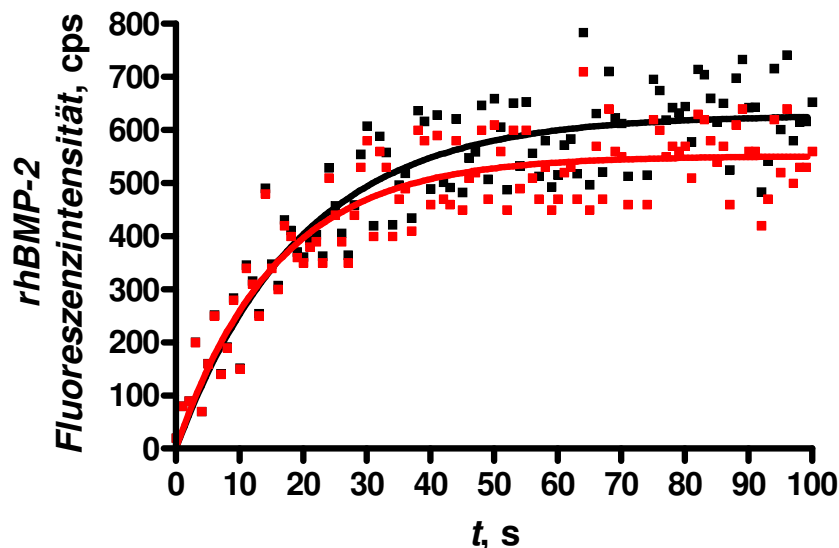


Abb. 43. Einfluß von Photobleaching auf den Fluoreszenzverlauf bei der Adsorption aus einer verdünnten Proteinlösung. Adsorption von rhBMP-2 ($c = 0,385 \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas bei Einleitung mit einer Luftblase. Für beide Kinetiken wurde nur jeder zehnte Meßpunkt verwendet. Rot: Kinetik beinhaltet Photobleaching ($k_{obs}^m = 0,0635 \pm 0,0050 \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} = 10,9 \pm 0,9 \text{ s}$, $P = 0,583$, $r^2 = 0,800$). Schwarz: Korrigierte Kinetik ohne Photobleaching ($k_{obs}^o = 0,0513 (\pm 0,0039 \text{ s}^{-1})$, $t_{1/2} = 13,5 \pm 1,1 \text{ s}$, $P = 0,580$, $r^2 = 0,825$). Durchgezogene Kurven: Anpassungen an einfache exponentielle Funktionen. Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Versuchsbedingungen, siehe **Abb. 35**.

In **Abb. 43** ist der Fluoreszenzverlauf für eine Adsorption von rhBMP-2 ($c = 0,384 \mu\text{mol/l}$) an einer Quarzglasoberfläche dargestellt. Die Einleitung der Proteinlösung erfolgte mit einer Luftblase. Die experimentelle Adsorptionskinetik mit allen Meßpunkten (1000) ist aus Gründen der Übersichtlichkeit fortgelassen und findet sich in **Abb. 56** (Kinetik A). Die rot dar-

gestellte Kinetik in **Abb. 43** zeigt den Fluoreszenzanstieg unter Einfluß des Photobleachings. Sie konnte an eine einfache exponentielle Funktion angepaßt werden (rote Kurve, $r^2 = 0,800$). Hieraus wurde die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs}^m = 0,0635 \pm 0,0050 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 10,9 \pm 0,9 \text{ s}$) berechnet. Der Residualwert ist $P = 0,583$. Bei der schwarz abgebildeten Kinetik wurde der Fluoreszenzverlust durch Photobleaching herausgerechnet (Gl. 97). Sie konnte an eine einfache exponentielle Funktion ($r^2 = 0,825$) angepaßt werden (schwarze Kurve, $P = 0,580$). Die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante beträgt $k_{obs}^o = 0,0513 \pm 0,0039 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 13,5 \pm 1,1 \text{ s}$). Mit zunehmender Bestrahlungsdauer weicht die gemessene Fluoreszenz (rote Anpassungskurve in **Abb. 43**) immer mehr von der korrigierten Fluoreszenz (schwarze Anpassungskurve in **Abb. 43**) ab. Beim Vorliegen des Adsorptionsgleichgewichtes wurde bei Dauerbestrahlung mit UV-Licht nach 100 s eine Fluoreszenz von $N_a = 551 \text{ cps}$ gemessen. Sie ist um 12 % niedriger als die berechnete Fluoreszenz von $N_a = 629 \text{ cps}$ ohne Einfluß des Photobleachings. Für die Adsorption mit und ohne Einfluß von Photobleaching (**Abb. 43**) sind die kinetischen und statistischen Daten in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 10. Änderung der kinetischen und statistischen Größen durch Photobleaching bei der Adsorption aus einer verdünnten rhBMP-2-Lösung ($c = 0,384 \text{ } \mu\text{mol/l}$).

kinetische Daten	mit Photobleaching, experimentell (jeder 10. Meßwert)	ohne Photobleaching, korrigiert (jeder 10. Meßwert)	mit Photobleaching, experimentell (alle Meßwerte)
N_a	551 cps	629 cps	543 cps
k_{obs}	$0,0635 \pm 0,0050 \text{ s}^{-1}$	$0,0513 \pm 0,0039 \text{ s}^{-1}$	$0,0737 \pm 0,0021 \text{ s}^{-1}$
$t_{1/2}$	$10,9 \pm 0,9 \text{ s}$	$13,5 \pm 1,1 \text{ s}$	$9,4 \pm 0,3 \text{ s}$
P	0,583	0,580	0,964
r^2	0,800	0,825	0,732

Linke Spalte: Mit Photobleaching (experimentell, 100 Meßwerte). Mittlere Spalte: Ohne Photobleaching (korrigiert, 100 Meßwerte). Rechte Spalte: Mit Photobleaching, (experimentell, 1000 Meßwerte, siehe Kinetik A in **Abb. 56**). $\bar{x} = S.E.$

Die Geschwindigkeitskonstanten nach punktgenauer Korrektur (**Abb. 43**) unterscheiden sich mit $k_{obs}^m = 0,0635 \pm 0,0050 \text{ s}^{-1}$ und $k_{obs}^o = 0,0513 \pm 0,0039 \text{ s}^{-1}$ nur wenig voneinander, siehe **Tab. 10**. Es wurde angenommen, daß dieser Unterschied auch für die Geschwindigkeitskonstanten besteht, wenn alle Meßpunkte einbezogen werden und nicht nur jeder 10. Meßwert. Unter Gültigkeit dieser Annahme wurden die k_{obs} -Werte aus den experimentell ermittelten Adsorptionskinetiken mit den Bleachkonstanten multipliziert, um die photochemische Zerstörung herauszurechnen. Für die Konzentration von $c = 0,384 \text{ } \mu\text{mol/l}$ beträgt die Bleachkonstante

$f_B = 0,8077$ (siehe **Tab. 16**). Der Residualwert ist bei der Anpassung der experimentell ermittelten Adsorptionskinetik deutlich größer, da alle Meßpunkte (1000) zu seiner Berechnung verwendet wurden. Die Größe der unkorrigierten und korrigierten k_{obs} -Werte aus den Adsorptionskinetiken mit 100 Meßwerten unterscheiden sich um etwa 12 % voneinander. Da die Fehlerstreuung genauso hoch ist wie die Streuung zwischen den Einzelexperimenten (siehe **Tab. 8**), kann die photochemische Zerstörung vernachlässigt werden.

Mit der Anwendung hoher rhBMP-2-Konzentrationen, verringert sich der Einfluß des Photobleachings, da die Adsorptionen schneller ablaufen und die maximale Fluoreszenz früher erreicht wird. Bei der Verwendung einer Proteinlösung mit $c = 12,69 \mu\text{mol/l}$ (in NaAc, $pH = 4,5$), wurde die maximale Fluoreszenz bereits nach 10 s erreicht, wie **Abb. 44** zeigt. Zu sehen sind darin zwei Kinetikverläufe, die an eine einfache exponentielle Funktion angepaßt wurden (durchgezogene Linien). Die experimentell ermittelte Adsorptionskinetik (alle Meßpunkte) ist nicht abgebildet.

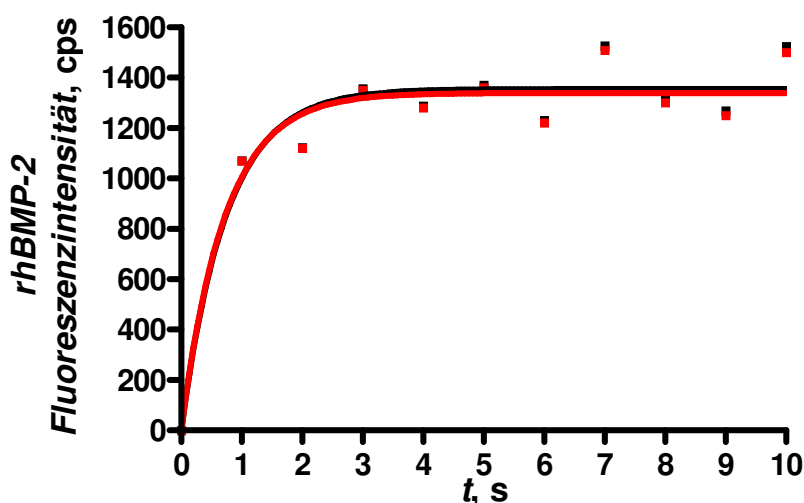


Abb. 44. *Einfluß von Photobleaching auf den Fluoreszenzverlauf bei der Adsorption aus einer konzentrierten Proteinlösung. Adsorption von rhBMP-2 ($c = 12,69 \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas bei Einleitung mit einer Luftblase. Für beide Kinetiken wurde nur jeder zehnte Meßpunkt verwendet. Rot: Kinetik beinhaltet Photobleaching ($k_{obs}^m = 1,384 \pm 0,315 \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} = 0,50 \pm 0,17 \text{ s}$, $P = 0,976$, $r^2 = 0,938$). Schwarz: Korrigierte Kinetik ohne Photobleaching ($k_{obs}^o = 1,340 \pm 0,303 \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} = 0,52 \pm 0,18 \text{ s}$, $P = 0,976$, $r^2 = 0,937$). Durchgezogene Kurven: Anpassungen an einfache exponentielle Funktionen. Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Versuchsbedingungen, siehe **Abb. 35**. $\bar{x} = S.E.$*

Zu sehen ist in **Abb. 44**, daß sich beide Anpassungskurven nahezu überlagern. Auch hier wurde nur jeder zehnte Meßwert zur Berechnung der kinetischen Daten eingesetzt (punktegenaue Korrektur). Der Residual Runs Test ergab für beide Anpassungen den Residualwert $P = 0,976$.

Die Adsorptionskinetik, die den Einfluß des Photobleachings beinhaltet, ist in **Abb. 44** rot dargestellt. Aus der exponentiellen Anpassung (rote Kurve, $r^2 = 0,938$) wurde die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs}^m = 1,384 \pm 0,315 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,50 \pm 0,17 \text{ s}$) berechnet. Ohne Einfluß von Photobleaching folgt aus der korrigierten Adsorptionskinetik (schwarze Kurve, $r^2 = 0,937$) die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{obs}^o = 1,340 \pm 0,303 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,52 \pm 0,18 \text{ s}$). Im Adsorptionsgleichgewicht wurde mit Einfluß des Photobleachings eine maximale Fluoreszenz von $N_a = 1340 \text{ cps}$ gemessen. Nach Korrektur der Adsorptionskinetik ergibt sich eine maximale Fluoreszenz von $N_a = 1355 \text{ cps}$.

In **Tab. 11** sind die kinetischen Größen für Adsorptionskinetiken mit (experimentell) und ohne Photobleaching (korrigiert) zusammengefaßt. Für beide Kinetiken wurde eine reduzierte Datenmenge eingesetzt (jeder 10. Meßwert). Zusätzlich sind die kinetischen Größen für die experimentelle Kinetik aufgeführt, welche alle Meßwerte (100) enthält.

Tab. 11. Änderung der kinetischen und statistischen Größen durch Photobleaching bei der Adsorption aus einer konzentrierten rhBMP-2-Lösung ($c = 12,69 \text{ } \mu\text{mol/l}$).

kinetische Daten	mit Photobleaching, experimentell (jeder 10. Meßwert)	ohne Photobleaching, korrigiert (jeder 10. Meßwert)	mit Photobleaching, experimentell (alle Meßwerte)
N_a	1340 cps	1355 cps	1381 cps
k_{obs}	$1,384 \pm 0,315 \text{ s}^{-1}$	$1,340 \pm 0,303 \text{ s}^{-1}$	$0,8663 \pm 0,0624 \text{ s}^{-1}$
$t_{1/2}$	$0,50 \pm 0,17 \text{ s}$	$0,52 \pm 0,18 \text{ s}$	$0,80 \pm 0,06 \text{ s}$
P	0,976	0,976	0,218
r^2	0,938	0,937	0,821

Linke Spalte: Mit Photobleaching (experimentell, 10 Meßwerte). Mittlere Spalte: Ohne Photobleaching (korrigiert, 10 Meßwerte). Rechte Spalte: Mit Photobleaching, (experimentell, 100 Meßwerte, ohne Abbildung). $\bar{x} = S.E.$

Aus **Tab. 11** ist zu entnehmen, daß die aus den Anpassungen der Adsorptionskinetiken (10 Meßwerte) erhaltenen kinetischen und statistischen Daten kaum Unterschiede aufweisen. Allerdings sind die Standardfehler um den Faktor 5 größer. Dies ist auf die Verwendung einer stark reduzierten Datenmenge (10 Meßwerte) zurückzuführen. Auffallend ist, daß der Residual- und k_{obs} -Wert bei der Anpassung der experimentell ermittelten Adsorptionskinetik mit allen Meßwerten deutlich geringer ist. Die statistische Auswahl der Meßpunkte (jeder 10. Meßwert) führt dazu, daß zu Beginn der Adsorptionskinetik keine Datensätze mehr vorliegen (**Abb. 44**). Für die Proteinkonzentration von $c = 12,69 \text{ } \mu\text{mol/l}$ wurde die Bleachkonstante $f_B = 0,9682$ berechnet (siehe **Tab. 16**).

4.3.3 Fluoreszenzquenching von rhBMP-2 bei Adsorptionen

Der Vergleich der Adsorptionsisotherme für die Adsorption von unmarkiertem rhBMP-2 (Beladungen aus der Fluoreszenz berechnet) mit einer unabhängigen direkten Messung (Radioiodmethode) ist in **Abb. 59** dargestellt und zeigt, daß die Gleichgewichtsbeladungen aus der Radioiodmethode (Γ_{125I}) höher sind als die Gleichgewichtsbeladungen am TIRF-Rheometer (Γ_{TIRF}). Die Division der Beladungen ergibt die Quenchfaktoren, um welche die Fluoreszenz im TIRF-Rheometer ausgelöscht wird. Die photochemische Zerstörung spielt bei der Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas und an PDLA keine signifikante Rolle, wie aus **Abb. 42** zu entnehmen ist (die Blechkonstanten liegen zwischen 0,8 und 1,0). Mit Zunahme der photochemischen Zerstörung wird das Fluoreszenzquenching immer geringer, da immer weniger Fluorophore im Molekül vorhanden sind. Für fünf Konzentrationen wurden die Quenchfaktoren berechnet, siehe **Tab. 12**.

Tab. 12. Gleichgewichtsbeladungen für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas aus Radioiod- und TIRF-Methode für verschiedene Proteinkonzentrationen nebst Quenchfaktoren. *

rhBMP-2-Konzentration [μmol/l]	Beladung im Adsorptionsgleichgewicht [μg/cm ²]		Quenchfaktoren
	Radioiodmethode	TIRF-Methode **	
0,385	0,26	0,090	2,89
0,962	0,29	0,115	2,52
1,92	0,36	0,165	2,18
3,85	0,40	0,238	1,68
7,69	0,45	0,295	1,53

* Beladungen wurden entnommen aus **Abb. 59**. ** Beladungen nach Kreuzmethode berechnet (siehe **Kap. 4.4.2**).

Wie **Tab. 12** zeigt, muß für jede Gleichgewichtsbeladung ein anderer Quenchfaktor angewendet werden, da im Verlaufe der Adsorption die Beladung ansteigt. Aus diesem Grund erweist es sich als zweckmäßig, die in **Tab. 12** angegebenen Quenchfaktoren gegen die Gleichgewichtsbeladungen aus der TIRF-Methode aufzutragen.

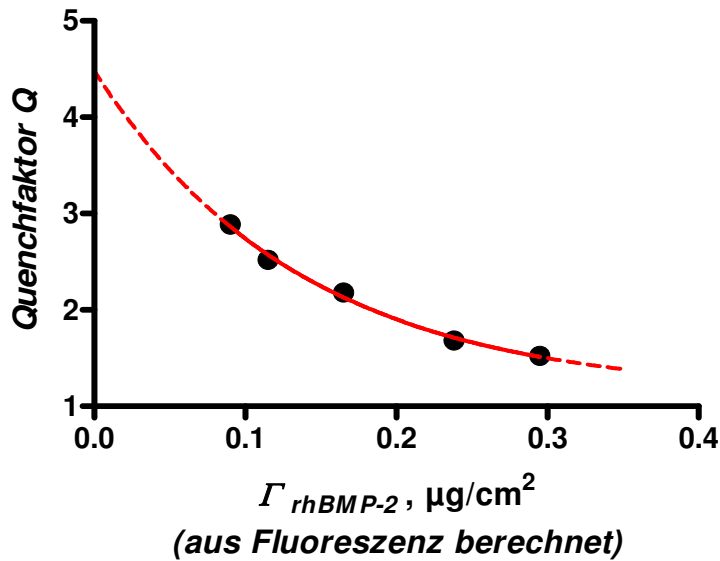


Abb. 45. *Abhängigkeit der Quenchfaktoren von der Oberflächenkonzentration. Anpassung (rote durchgezogene Kurve) an eine einfache exponentielle Funktion ($P = 1,000$, $r^2 = 0,995$). Span: 3,35. Gestrichelte Kurve: Durch Extrapolation verlängerte Anpassungskurve, aus welcher für das Plateau $Q = 1,13$ und für den Abzissenschnittpunkt Y_{max} der Wert $Q = 4,48$ entnommen wurden. Die Quenchfaktoren Q ergeben sich aus der Division der Beladungen aus dem Radioiodexperiment durch die Beladungen, die aus der Fluoreszenz berechnet wurden.*

Die Datensätze (schwarze Punkte in **Abb. 45**) wurden an eine einfache exponentielle Funktion angepaßt (rote, durchgezogene Kurve in **Abb. 45**). Der Residualwert dieser Anpassung ist $P = 1,000$ ($r^2 = 0,995$). Mit zunehmender Oberflächenbeladung findet man wider Erwarten eine Verringerung der Quenchfaktoren. Das Plateau von $Q = 1,13$ wurde aus der extrapolierten Verlängerung (gestrichelte Kurve) der Anpassungskurve durch den Rechner vorgegeben. Ein Plateau von $Q = 1$ ist nur ein theoretischer Wert. Experimentell wird dieser Wert niemals erreicht werden können, da hierfür die Oberflächenkonzentration von rhBMP-2 unendlich hoch sein muß. Das maximale Fluoreszenzqueching ($Q = 4,48$) ergibt sich aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Verlängerung der Anpassungskurve mit der Abzisse. Zwar können für Konzentrationen unterhalb von $c = 0,385 \mu\text{mol/l}$ über die Radioiodmethode die Gleichgewichtsbeladungen ermittelt werden; über Fluoreszenzmessungen am TIRF-Rheometer ist dies aber nicht möglich, da man an die Nachweisgrenze gelangt. Wegen des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses ist dann eine eindeutige Bestimmung der Oberflächenkonzentrationen nicht mehr möglich.

Die Multiplikation der Oberflächenkonzentrationen, die aus den Fluoreszenzen mit Gl. 36 berechnet wurden, mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45**, erfolgte erst nach Anpassung der Adsorptionskinetiken an einfache exponentielle Funktionen. Aus der Anpassungskurve (rote

Kurve in Kinetik **A** in **Abb. 46**) wurden etwa 12 Meßpunkte entnommen, welche ebendort als schwarze Punkte dargestellt sind. Jeder Meßpunkt wurde mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** korrigiert. Die korrigierten Meßpunkte sind in Kinetik **B** (**Abb. 46**) als Dreiecke abgebildet. Die photochemische Zerstörung ist in den Quenchfaktoren enthalten.

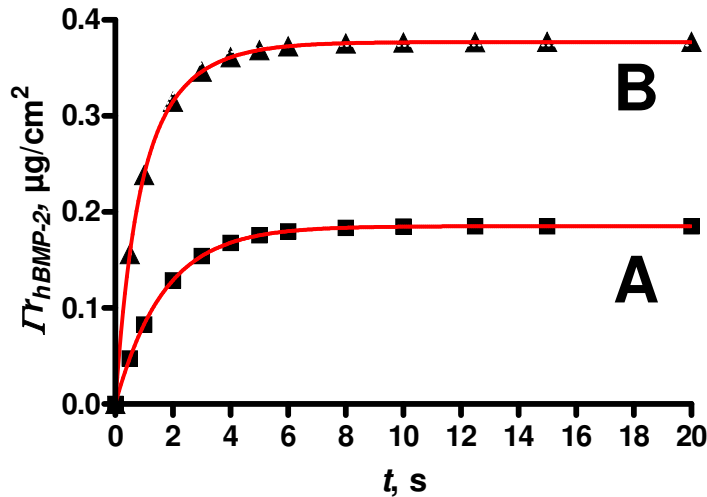


Abb. 46. Adsorptionskinetik von rhBMP-2 ($c = 7,69 \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas ohne (**A**) und mit (**B**) Quenchkorrektur. **A:** Kinetik nicht mit Quenchfaktoren korrigiert. Aus der Anpassungskurve der gemessenen Adsorptionskinetik wurden 12 Meßpunkte (■) entnommen und mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** korrigiert. **B:** Anpassung der korrigierten Meßpunkte (▲) an eine zweifach exponentielle Funktion. Statistische Daten, siehe Text hiernach.

Dargestellt sind in **Abb. 46** zwei Adsorptionskinetiken für die Adsorption von rhBMP-2 ($c = 7,69 \mu\text{mol/l}$) an ultrahydrophilem Quarzglas. Aus der Anpassungskurve der gemessenen Adsorptionskinetik (nicht abgebildet), wurden 12 Meßpunkte entnommen. Diese sind **Abb. 46** Kinetik **A** als quadratische Punkte dargestellt. Die durchgezogene Kurve zeigt die Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion ($P = 1,000$ und $r^2 = 1,000$). Aus der Anpassung konnte die konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{\text{obs}} = 0,5929 \pm 0,0000 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1,17 \pm 0,00 \text{ s}$) ($\bar{x} = S.E.$) entnommen werden. Nach Korrektur der Adsorptionskinetik **A** (**Abb. 46**) mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** ergibt sich die Kinetik **B** in **Abb. 46**, welche nur an eine zweifach exponentielle Funktion (durchgezogene Kurve, $P = 0,279$ und $r^2 = 1,000$) angepaßt werden konnte. Daraus ergeben sich die beiden konzentrationsabhängigen Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{obs,A}} = 1,724 \pm 0,024 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,40 \pm 0,01 \text{ s}$) und $k_{\text{obs,B}} = 0,640 \pm 0,006 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 1,08 \pm 0,02 \text{ s}$). Die Anpassung von korrigierten Adsorptionskinetiken an einfache exponentielle Funktionen (nicht abgebildet) führte zu Residualwerten von $P < 0,05$. Die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas und PDLLA verläuft offensichtlich über zwei parallel verlaufende Prozesse, die durch das Fluoreszenzquenching überdeckt werden.

4.3.4 Fluoreszenzverhalten von adsorbiertem rhBMP-2 nach einer Verweildauer von 47 Stunden

Die Desorptionsexperimente am TIRF-Rheometer erstreckten sich teilweise über bis zu 124 h. Daher wurde zunächst geprüft, ob die lange Verweildauer der Proteinmoleküle auf der Oberfläche zu einer Veränderung der Fluoreszenz führt. Dazu wurde über einen Zeitraum von 47 h unter Gleichgewichtsbedingungen eine Proteinlösung mit $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ im Kreislauf durch die Meßzelle geführt. Die Durchleitung von Pufferlösung würde dagegen zu einer Desorption des Proteins und damit zu einem Abfall der Fluoreszenz führen. Eine Beobachtung über 47 h hinaus scheiterte bei mehreren Versuchen daran, daß der Zufluß zur Meßzelle (J in *Abb. 21*) verstopfte. Bei Experimenten in stehender Proteinlösung trocknete nach 20 h die Proteinlösung in der Meßzelle ein. Die Substitution adsorbierter Proteinmoleküle durch in der Lösung befindliche Moleküle kann wegen der starken Adsorptionshysterese [32] vernachlässigt werden.

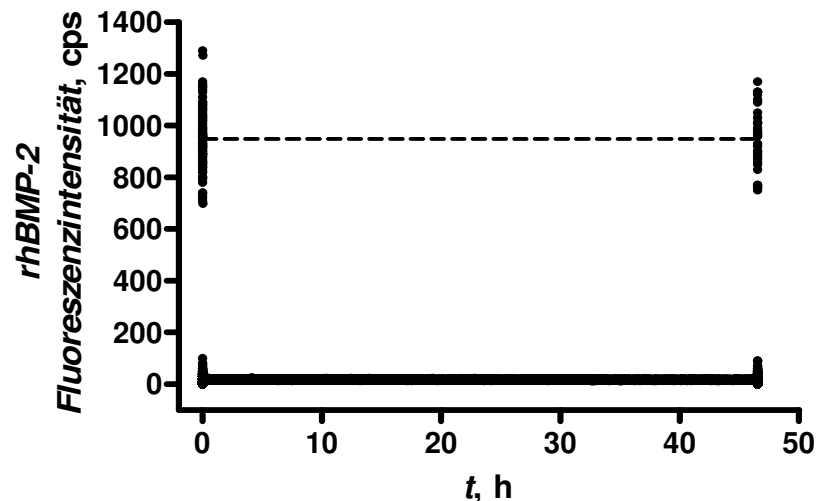


Abb. 47. Nachweis der Adsorptionsgleichgewichtseinstellung ohne Einfluß von Photobleaching und Desorption. Über adsorbiertes rhBMP-2 ($c = 0,348 \mu\text{mol/l}$) wurde über 47 h eine rhBMP-2-Lösung ($c = 0,348 \mu\text{mol/l}$) mit $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$ geleitet. Zu Beginn der Messung wurde eine Fluoreszenz von $950 \pm 109 \text{ cps}$ (77) und nach 47 h eine Fluoreszenz von $953 \pm 124 \text{ cps}$ (32) gemessen. Die waagerechte Linie stellt den Mittelwert von $\bar{N}_a = 952 \pm 114 \text{ cps}$ (109) dar. In Klammern steht die Anzahl der Wertepaare, die zur Mittelwertbildung herangezogen wurden. $\bar{x} = x_G$.

Die *Abb. 47* zeigt ein Experiment, bei dem zu Beginn eine Fluoreszenz von $950 \pm 109 \text{ cps}$ (77) gemessen wurde. Die Werte in Klammern geben die Anzahl der Wertepaare an, die zur Mittelwertbildung herangezogen wurden. Nach Durchleitung von rhBMP-2-Lösung über 47 h, blieb die gemessene Fluoreszenz mit $953 \pm 124 \text{ cps}$ (32) konstant.

4.3.5 Untersuchung der Fluoreszenz bei Desorptionen mit unterschiedlichen Belichtungsraten und Kontrollexperiment

Da die Trennung zwischen Photobleaching und Fluoreszenzquenching bei Desorptionen nicht ohne weiteres möglich ist, werden diese beiden Einflüsse in einem Kapitel abgehandelt. Die Begriffe Desorption und Desorptionsgeschwindigkeitskonstante werden unter dem Vorbehalt verwendet, daß sie den Einfluß des UV-Lichtes (Photobleaching und Fluoreszenzquenching) beinhalten. Lediglich beim Kontrollexperiment mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 sind Photobleaching und Fluoreszenzquenching ausgeschlossen.

Zunächst wurde, analog der Experimente zur Bestimmung des Einflusses der UV-Strahlung bei Adsorptionen, das Protein rhBMP-2 ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) auf Quarzglas adsorbiert (**Abb. 40**) und anschließend im Gleichgewichtszustand in einer Proteinlösung gleicher Konzentration inkubiert. Bei Inkubationsdauern von 500 s wurde die Proteinlösung ohne Durchfluß in der Meßzelle belassen, während bei Inkubationsdauern von 19 h die Proteinlösung im Kreislauf durch die Meßzelle geführt wurde. Nach der Inkubation in Proteinlösung (500 s bzw. 19 h) wurde die Proteinlösung durch Pufferlösung ausgetauscht, die dann für 500 s in der Meßzelle belassen wurde, um die Burstphase zu beseitigen. Die hier beschriebenen Vorgänge werden im weiteren Text als Vorinkubation bezeichnet. Danach wurden die Desorptionsexperimente bei unterschiedlichen Belichtungsraten durchgeführt. Es wurden drei Arten von Desorptionsexperimenten durchgeführt, bei denen die Belichtungsraten und die Dauer der Inkubationen variiert wurden. Die Belichtungsrate gibt die Belichtungsdauer in Sekunden pro Stunde an. Eine Belichtungsrate von 3600 s/h entspricht demnach einer Dauerbelichtung. Als Kontrollexperiment wurde ein Desorptionsexperiment mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 durchgeführt (**Kap. 3.3.11**).

In diesem Kapitel wurden die Geschwindigkeitskonstanten zusätzlich mit hochgestellten Indizes versehen. Konstanten aus Experimenten nach einer Vorinkubation über 500 s (**Kap. 3.3.8.5**), die bei einer Belichtungsrate von 124 s/h durchgeführt wurden, sind mit dem Index γ gekennzeichnet. Konstanten aus Experimenten, ebenfalls nach einer Vorinkubation über 500 s, die bei einer Belichtungsrate von 21 s/h durchgeführt wurden, erhielten den Index β und α wenn sie nach einer Vorinkubation über 19 h durchgeführt wurden. Konstanten aus dem Kontrollexperiment mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 (nach Gleichgewichtseinstellung über 19 h, **Kap. 3.3.11**) wurden nicht indiziert.

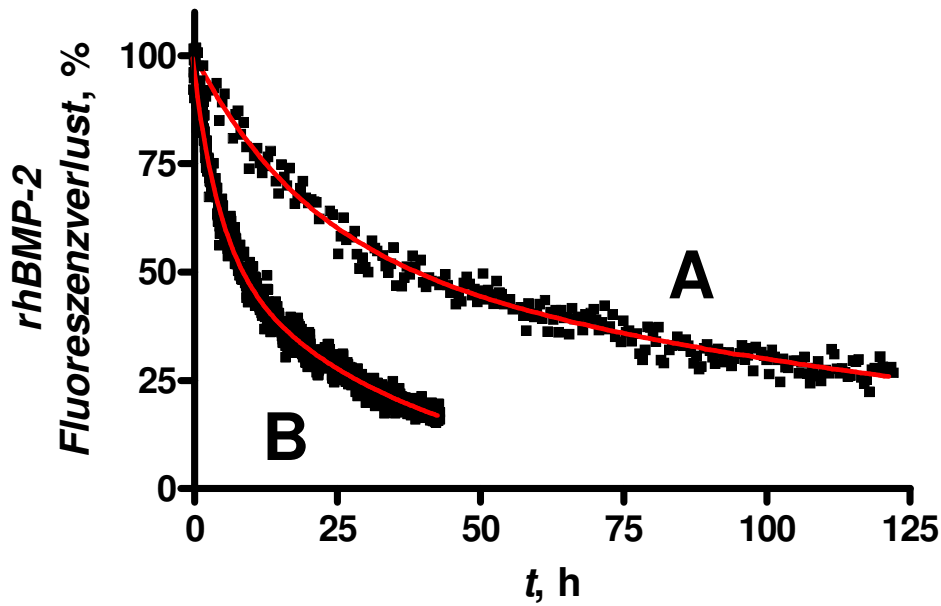


Abb. 48. Fluoreszenzverlust unter Desorptionsbedingungen ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) bei unterschiedlichen Belichtungsraten aber gleichen Gesamtbelichtungszeiten. Vor den Experimenten erfolgte eine Vorinkubation über 500 s in rhBMP-2-Lösung und danach für 500 s in PBS. Durchflußrate des PBS-Puffers: $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$. Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. A: $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 13,2 \pm 1,3 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 105,1 \pm 8,1 \text{ h}$). Gesamtbelichtungszeit: 43 min (Belichtungsrate: 21 s/h). Span1: 43 %, Span2: 57: %. Fluoreszenz: 100 % = 1589 cps. B: $k_{-2}^{\gamma} = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,1 \pm 0,1 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\gamma} = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24,3 \pm 0,5 \text{ h}$). Gesamtbelichtungszeit: 38 min (Belichtungsrate: 124 s/h). Span1: 44 %, Span2: 56 %. Fluoreszenz: 100 % = 1886 cps. Rote Kurven: Anpassungskurven mit $P = 0,156$ (Kinetik A) und $P < 0,0001$ (Kinetik B). Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. $\bar{x} = S.E.$

In **Abb. 48** sind zwei Experimente dargestellt, die den Fluoreszenzverlust bei annähernd gleicher Gesamtbelichtungszeit (Experiment A 43 min und Experiment B 38 min) während der Desorption bei $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$ zeigen. Damit beide Kinetiken miteinander verglichen werden konnten, wurden die Fluoreszenzen auf 100 % normiert. Vor beiden Experimenten wurde eine Vorinkubation für jeweils 500 s in stehender Proteinlösung und anschließend in stehendem PBS-Puffer durchgeführt (**Abb. 40**). Die Kinetik A wurde 124 h lang bei einer Belichtungsrate von 21 s/h (Index β) beobachtet, indem das adsorbierte rhBMP-2 im Wechsel nach einer 1700 s dauernden Dunkelphase für 10 s belichtet wurde. Aus dem Experiment (Kinetik A in **Abb. 48**) wurden die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 13,2 \pm 1,3 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 105,1 \pm 8,1 \text{ h}$) berechnet. Die Kinetik konnte an eine zweifache exponentielle Funktion (rote Kurve in **Abb. 48**, $r^2 = 0,982$) angepaßt werden. Der Residual Runs Test ergab ein Residualwert von $P = 0,156$. Zu Beginn des Experimentes (Kinetik A in

Abb. 48) wurde eine Fluoreszenz von $N_a = 1589$ cps gemessen. Die Kinetik **B** in **Abb 48** wurde bei einer Belichtungsrate von 124 s/h (Index γ) erhalten, bei der die Belichtung mit UV-Licht alle 290 s für 10 s erfolgte. Es wurden die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^\gamma = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,1 \pm 0,1 \text{ h}$) und $k_{-3}^\gamma = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24,3 \pm 0,5 \text{ h}$) gefunden. Zu Beginn wurde eine Fluoreszenz von $N_a = 1893$ cps gemessen. Da das Experiment nach etwa 48 h wegen technischer Probleme abgebrochen werden mußte, repräsentiert die Kinetik überwiegend nur die schnellabfallende Phase. Möglicherweise ergibt sich deshalb aus der Anpassung (rote Kurve in Kinetik **B** in **Abb 48**) der schlechte Residualwert von $P = < 0,0001$.

Daß bei den Experimenten in **Abb. 48** zwei Geschwindigkeitskonstanten gefunden wurden, gibt einen Hinweis auf das Vorhandensein von zwei rhBMP-2-Spezies mit unterschiedlichen Affinitäten. Der schnell abfallende Anteil der Kinetiken (Span1) umfaßt 43 % (Kinetik **A**) bzw. 44 % (Kinetik **B**). Der langsam abfallende Anteil (Span2) umfaßt 57 % (Kinetik **A**) bzw. 56 % (Kinetik **B**). Die Geschwindigkeitskonstante des schneller abfallenden Anteils ist bei der Belichtungsrate von 21 s/h um den Faktor $f_{21}^{124} = 0,235$ kleiner als bei der Belichtungsrate von 124 s/h. Beim langsam abfallenden Anteil ist die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor $f_{21}^{124} = 0,232$ kleiner. Die Veränderung der Belichtungsrate beeinflusst offensichtlich beide adsorbierten rhBMP-2-Spezies gleich stark.

Auf die Durchführung eines Kontrollexperimentes mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 am TIRF-Rheometer mußte aus sicherheitstechnischen Gründen verzichtet werden, siehe **Kap. 3.3.11**. Die Durchführung eines Desorptionsexperimentes an rechtwinkligen Quarzglasplatten wie in **Kap. 3.3.11** ist zwar möglich, doch ist die vor dem Desorptionsexperiment notwendige Beschichtung der Quarzglasplatten mit rhBMP-2 im Batchverfahren über den kurzen Zeitraum von 500 s wegen der Transportlimitierung nicht vergleichbar mit der transportlimitierungsfreien Adsorption am TIRF-Rheometer über denselben Zeitraum. Auch aus diesem Grunde wurde kein Kontrollexperiment nach einer Gleichgewichtseinstellung von 500 s durchgeführt.

Im Experiment **A** in **Abb. 48** wurde nach 124 h nur noch 14,5 % der ursprünglichen Fluoreszenz ($N_a = 1589$ cps = 100 %) gemessen. Um zu überprüfen, ob die längere Verweildauer (124 h) der rhBMP-2-Moleküle auf der Quarzglasoberfläche zu einer Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten im Vergleich zum Experiment in **Abb. 41** führt, erfolgte eine dauerhafte Belichtung mit UV-Licht für etwa 80 Minuten.

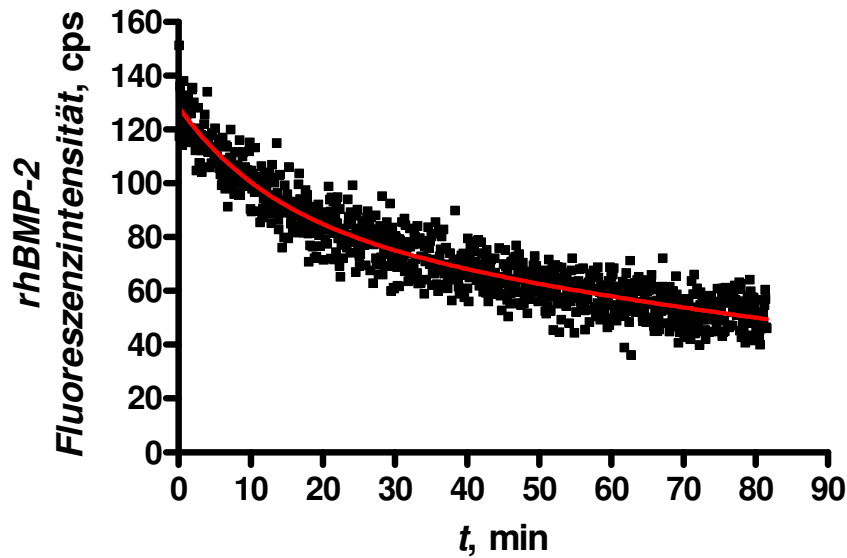


Abb. 49. Dauerbelichtung von adsorbiertem rhBMP-2 nach einer Verweilzeit von 124 h auf der Quarzglasoberfläche. Die Kinetik wurde an eine zweifache exponentielle Funktion (rote Kurve, $r^2 = 0,899$) angepaßt ($P = 0,601$). Das Photobleachexperiment erfolgte im Durchfluß ($\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$). $k_{-1}^p = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 8,7 \pm 1,1 \text{ min}$) und $k_{-2}^p = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 97,4 \pm 7,5 \text{ min}$). Die Desorption (entnommen aus **Abb. 48**, Kinetik A) von 0,3 % ist vernachlässigbar gering. Span1: 31 % (88 cps). Span2: 69 % (40 cps). Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. $\bar{x} = S.E.$

Die Dauerbestrahlung mit UV-Licht führte offensichtlich zu einer raschen Zerstörung der nach dem Desorptionsexperiment (Kinetik A in **Abb. 48**) noch auf der Quarzglasoberfläche gebundenen Proteinmoleküle. Nach etwa 80 Minuten reduzierte sich die Fluoreszenz bei Dauerbelichtung um 66 %. Obschon das Photobleachexperiment im Durchfluß mit 120 ml/h erfolgte, kann der Fluoreszenzverlust von 0,3 % (entnommen aus **Abb. 48** Kinetik A) infolge der Desorption vernachlässigt werden. Die Kinetik wurde an eine zweifach exponentielle Funktion ($r^2 = 0,899$) angepaßt (rote Kurve). Der Residual Runs Test ergibt für das gewählte Anpassungsmodell einen Residualwert von $P = 0,601$. Hieraus folgen die beiden Photobleachgeschwindigkeitskonstanten $k_{-1}^p = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 8,7 \pm 1,1 \text{ min}$) und $k_{-2}^p = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 97,4 \pm 7,5 \text{ min}$). Die Photobleachgeschwindigkeitskonstanten sind nach einer Verweildauer von 124 h (Kinetik A in **Abb. 48**) um den Faktor 2,2 bzw. 3,3 kleiner als nach einer Verweildauer von 3000 s (**Abb. 41**).

Zwei weitere Experimente erfolgten nach einer Vorinkubation über 19 h unter Gleichgewichtsbedingungen. Diese sind in **Abb. 50** dargestellt.

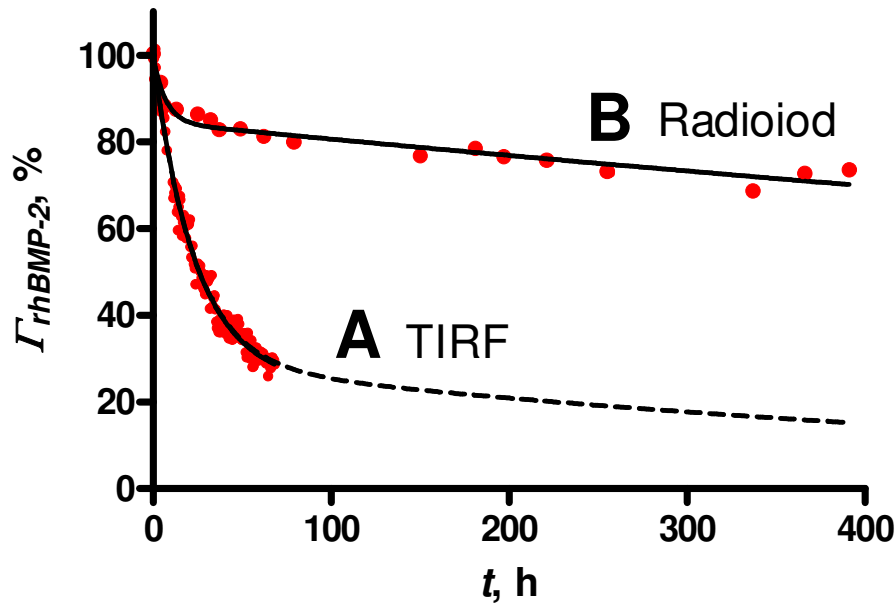


Abb. 50. Verringerung der Oberflächenkonzentration von adsorbiertem rhBMP-2. Beide Experimente wurden nach einer Vorinkubation über 19 h durchgeführt. **A:** Fluoreszenzabfall bei einer Belichtungsrate von 21 s/h (TIRF-Rheometer). Startbeladung: $\Gamma = 0,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (= 100 %). Durchflußrate: $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$. Scherrate: $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$. Dauer des Experimentes: 68 h. Kinetik wurde angepaßt an eine zweifache exponentielle Funktion (durchgezogene Kurve, $P = 0,052$, $r^2 = 0,984$). Ab 68 h wurde die Anpassung extrapoliert (gestrichelte Linie und nachfolgender Text). Geschwindigkeitskonstanten: $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 16,4 \pm 0,6 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 56,3 \pm 20,1 \text{ d}$). Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. **B:** Desorption (Radioiodmethode). Startbeladung: $\Gamma = 0,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (= 100 %). Durchflußrate: $\dot{V} = 10 \text{ ml/h}$. Scherrate: $\gamma = 0$. Desorptionsdauer: 391 h. Die Kinetik wurde an eine zweifache exponentielle Funktion (durchgezogene Kurve, $P = 0,399$, $r^2 = 0,951$) angepaßt. Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,7 \pm 1,4 \text{ h}$) und $k_{-3} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 60,3 \pm 7,1 \text{ d}$). Kinetikanteile: **A:** Span1 = 74 %, Span2 = 26 %. **B:** Span1 = 15 %, Span2 = 85 %. $\bar{x} = \text{S.E.}$

In **Abb. 50** sind zwei Kinetiken dargestellt, die mit unterschiedlichen Methoden beobachtet wurden. Bei Kinetik **A** wurde die Fluoreszenz am TIRF-Rheometer (Startbeladung $\Gamma = 0,23 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und bei Kinetik **B** (Startbeladung $\Gamma = 0,30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) die γ -Strahlung des radioaktiv markierten rhBMP-2 gemessen. Um einen Vergleich zwischen beiden Kinetiken zu ermöglichen, wurden die Startbeladungen beider Kinetiken auf 100 % normiert. Die Kinetik **A** (Index α) ergab nach einer zweifach exponentiellen Anpassung (durchgezogene Kurve, $r^2 = 0,984$) einen Residualwert von $P = 0,052$. Es wurden die Geschwindigkeitskonstanten

$k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 16,4 \pm 0,6 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 56,3 \pm 20,1 \text{ d}$) berechnet. Das Experiment (Kinetik **A** in **Abb. 50**) wurde am TIRF-Rheometer bei einer Belichtungsrate von 21 s/h durchgeführt. Der enorme Fehler der Geschwindigkeitskonstante des langsamer abfallenden Kinetikanteils liegt bei 36 % und kann damit erklärt werden, daß das Experiment wegen technischer Probleme vorzeitig abgebrochen werden mußte. Die gestrichelte Kurve ist eine durch Extrapolation erhaltene Verlängerung der Desorptionskinetik **A** in **Abb. 50**. Es wurde angenommen, daß ein länger andauerndes Experiment, die gleichen Geschwindigkeitskonstanten liefert. Der langsam abfallende Kinetikanteil umfaßt nur 26 % der Gesamtkinetik (siehe Spanwerte in Legende unter **Abb. 50**).

Das Kontrollexperiment mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 (Kinetik **B** in **Abb. 50**, ohne Index) erfolgte in zusammenschraubbaren Durchflußzellen (**Kap. 3.3.11**) bei einer Durchflußrate von $\dot{V} = 10 \text{ ml/h}$. Da beim Kontrollexperiment Photobleaching und Fluoreszenzquenching ausgeschlossen sind, wird hier, im Gegensatz zum Experiment **A** in **Abb. 50**, die reine Desorption beobachtet. Ideal wäre zwar die Durchführung eines Desorptionsexperimentes mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 am TIRF-Rheometer gewesen, doch mußte aus sicherheitstechnischen Gründen darauf verzichtet werden, siehe weiter oben und **Kap. 3.3.11**. Die Anpassung an eine zweifach exponentielle Funktion (durchgezogene Kurve, $r^2 = 0,951$) ergab den Residualwert $P = 0,399$. Es wurden die beiden Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,7 \pm 1,4 \text{ h}$) und $k_{-3} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 60,3 \pm 7,1 \text{ d}$) bestimmt. In beiden Kinetiken (**Abb. 50**) wurden für die langsamer verlaufenden Anteile die gleichen Geschwindigkeitskonstanten gefunden, nämlich $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A**) und $k_{-3} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **B**). Zur Umbenennung der Konstanten k_{-3}^{α} und k_{-3} , siehe **Kap. 4.5.1.3**.

Beim Kontrollexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) betrug der langsame verlaufende Kinetikanteil 85 %, während er beim Experiment am TIRF-Rheometer (Kinetik **A** in **Abb. 50**) nur noch 26 % betrug. Entsprechend umgekehrt verhält es sich mit den schnell verlaufenden Kinetikanteilen. Während die Geschwindigkeitskonstanten für die langsam verlaufenden Kinetikanteile gleich bleiben (siehe oben), findet man für den schnellen verlaufenden Kinetikanteil beim Kontrollexperiment sogar eine Vergrößerung der Geschwindigkeitskonstante von $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (beim TIRF-Experiment, Kinetik **A** in **Abb. 50**) auf

$k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (beim Radioiodexperiment, Kinetik **B** in **Abb. 50**) um den Faktor $f_0^{21} = 3,475$. Bei den langsam verlaufenden Kinetikanteilen beträgt dieser Faktor $f_0^{21} = 0,933$.

4.4 Berechnung der Oberflächenkonzentration von rhBMP-2 aus der Fluoreszenz

Zur Berechnung der Proteinkonzentration auf der Oberfläche ist die Kenntnis der Fluoreszenz des adsorbierten Proteins N_a und der evaneszente Anteil der Bulkphasenfluoreszenz N_b^e der Proteinlösung nötig, siehe Gl. 36. Die Fluoreszenz des adsorbierten Proteins ist mit dem verwendeten Versuchsaufbau einfach zugänglich, indem die Proteinlösung nach Abschluß der Adsorption durch Pufferlösung ausgetauscht wird (siehe Gl. 30 und Gl. 31 sowie **Abb. 7** und **51**). Der evaneszente Anteil der Bulkphasenfluoreszenz der Proteinlösung, kann nicht direkt gemessen werden, er ergibt sich aus der Gesamtfluoreszenz (Gl. 21) der Proteinlösung N_b^{tot} aus **Abb. 8**. Nach Hlady [20] kann die Gesamtfluoreszenz mit einem Bufferflush direkt bestimmt werden (siehe **Kap. 4.4.1**), sofern die eingesetzten Proteinkonzentrationen hinreichend hoch sind. In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Ermittlung der Bulkphasenfluoreszenz angewendet, die ohne den Bufferflush auskommt (siehe **Kap. 4.4.2**).

4.4.1 Berechnung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz von rhBMP-2-Lösungen mit dem Bufferflush nach Hlady [20]

Das Bufferflushexperiment (**Abb. 51**) führte nur bei einer rhBMP-2-Lösung mit der Konzentration $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ zu einem meßbaren Fluoreszenzabfall. Bei höherkonzentrierten Proteinlösungen fiel das Protein aus. Geringere rhBMP-2-Konzentrationen führten zu keinem signifikanten Fluoreszenzabfall (**Abb. 40**). Für jedes Bufferflushexperiment wurde die Meßzelle gereinigt (**Kap. 3.3.2**) und neu zusammengebaut.

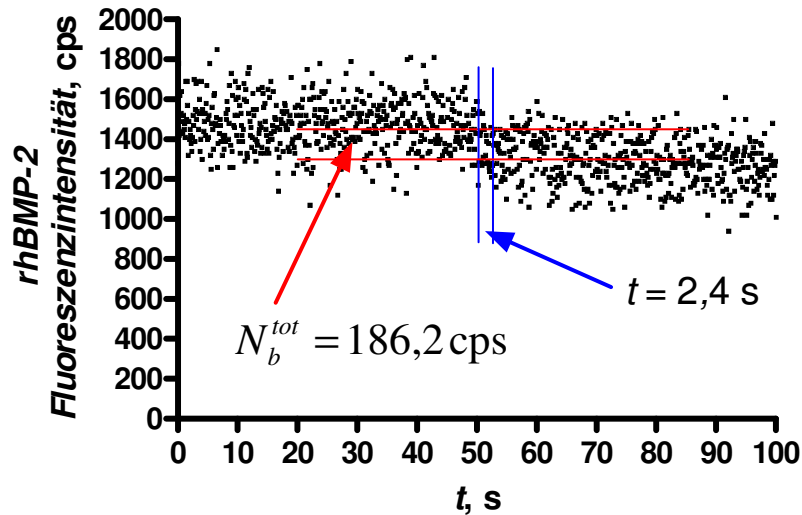


Abb. 51. Bufferflushexperiment nach Hlady. Die Proteinkonzentration in der Bulkphase beträgt $c = 12,69 \mu\text{mol/l}$. Obere rote Linie: Fluoreszenz vor dem Bufferflush $N_{b^*}^{\text{tot}} = 1477,5 \pm 131,3 \text{ cps}$. Untere rote Linie: Fluoreszenz nach dem Bufferflush $N_a = 1291,3 \pm 117,1 \text{ cps}$. Die Differenz ergibt die Gesamtfluoreszenz der Bulkphase von $N_b^{\text{tot}} = 186,2 \pm 16,7 \text{ cps}$. Die Ausspüldauer beträgt $t = 2,4 \text{ s}$. $\bar{x} = \text{S.E.}$ Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz (Gl. 96) folgt ein Ablesefehler von 19 %.

In **Abb. 51** ist ein Bufferflushexperiment dargestellt, bei dem die Bulkphase eine Proteinkonzentration von $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ besitzt. Die obere rote Linie kennzeichnet die mittlere Fluoreszenz $N_{b^*}^{\text{tot}} = 1477,5 \pm 131,3 \text{ cps}$ des adsorbierten Proteins zusammen mit der Fluoreszenz der Proteinmoleküle in der Bulkphase, siehe Gl. 20. Nach Durchleitung von PBS-Puffer wurde die Proteinlösung innerhalb von 2,4 s ausgespült (senkrechte blaue Linien in **Abb. 51**), so daß nur noch die Fluoreszenz $N_a = 1291,3 \pm 117,1 \text{ cps}$ des adsorbierten rhBMP-2 (untere rote Linie) gemessen wurde. Hieraus folgt für die Gesamtfluoreszenz der in der Bulkphase gelösten Proteinmoleküle $N_b^{\text{tot}} = 186,2 \pm 16,7 \text{ cps}$ (siehe **Tab. 13**). Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz (Gl. 96) folgt ein Ablesefehler von 19 %.

Die Ermittlung der Fluoreszenzbestandteile aus der Gesamtfluoreszenz N_b^{tot} der Proteinlösung ist nur unter Zuhilfenahme von Standards möglich. Hierzu wurden die am TIRF-Rheometer gemessenen Gesamtfluoreszenzen (Gl. 22) der Standardlösungen N_s^{tot} gegen die Extinktionen aufgetragen (**Abb. 24**). Da für Lösungen des Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan zu den Extinktionen eine lineare Abhängigkeit nach Lambert-Beer nur für Konzentrationen bis etwa $c = 50 \mu\text{mol/l}$ besteht (**Abb. 23 A**), wurden für höhere Konzentrationen die Extinktionen mit dem experimentell ermittelten Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_s = 4622,0 \pm 63,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ aus **Abb. 23 A** extrapoliert.

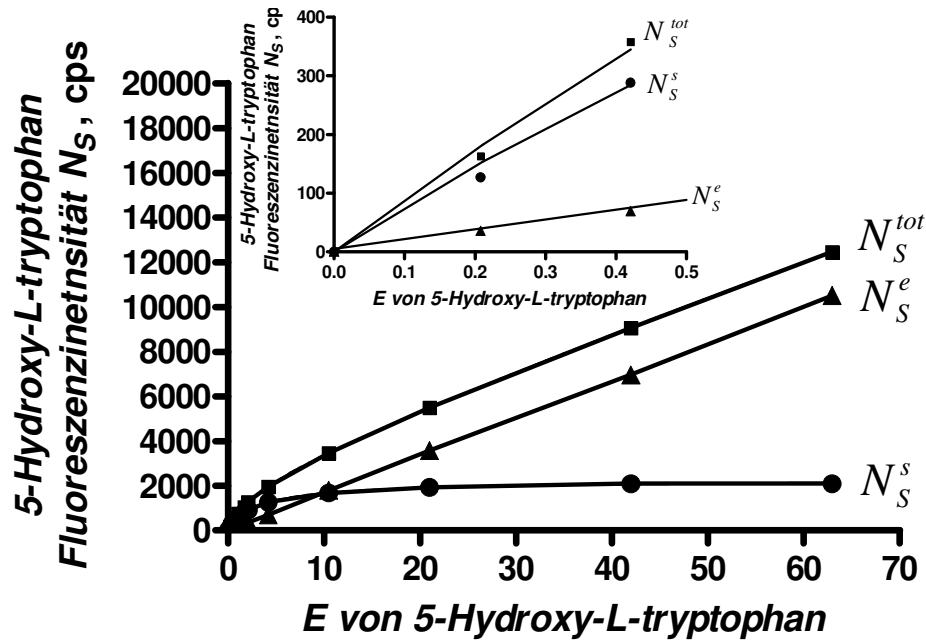


Abb. 52. Fluoreszenzanteile N_S von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen ($pH = 4,5$) in Abhängigkeit von der Extinktion. Obere Kurve (■): Gesamtfluoreszenz N_S^{tot} . Anpassung erfolgte an eine doppelt hyperbolische Funktion ($r^2 = 1,000$, $P = 0,976$). Mittlere Gerade (▲): Evaneszenter Anteil der Fluoreszenz N_S^e ($r^2 = 1,000$). Untere Kurve (●) Streulichtanteil der Fluoreszenz N_S^s . Anpassung erfolgte an eine doppelt hyperbolische Funktion ($r^2 = 1,000$, $P = 0,955$). Die insertierte Graphik zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzanteile für Extinktionen bis $E_S = 0,5$. Zur Bestimmung des $N_b^{e\circ}$ -Wertes (Erklärung siehe Text weiter unten) wird in Höhe der durch den Bufferflush (Abb. 51) ermittelten Fluoreszenz N_b^{tot} von der N_S^{tot} -Kurve (■) zur N_S^e -Geraden eine Lotfällung vollzogen.

In Abb. 52 sind die Fluoreszenzbestandteile von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen in Abhängigkeit von den Extinktionen dargestellt. Als Standard wurde deshalb 5-Hydroxy-L-tryptophan verwendet, da es nicht an der Quarzglasoberfläche adsorbiert. Zu erkennen ist in Abb. 52, daß oberhalb einer Extinktion von $E_S = 20$ für die Gesamtfluoreszenz N_S^{tot} (■) ein linearer Zusammenhang besteht. Wird der lineare Anteil in den Ursprung verschoben, gelangt man zum evaneszenten Anteil der Fluoreszenz N_S^e des gelösten Standards (▲). Der evaneszente Anteil der Fluoreszenz ist über alle Bereiche der Extinktion linear. Die Subtraktion des evaneszenten Fluoreszenzanteils (▲ in Abb. 52) von der Gesamtfluoreszenz (■ in Abb. 52) führt zur Fluoreszenz N_S^s , die aus der Anregung durch das Streulicht (● in Abb. 52) folgt und ab $E_S = 20$ nicht weiter ansteigt. Zur Bestimmung der Fluoreszenzanteile von Proteinlösungen aus Abb. 52 ist allerdings nur der Bereich bis zur einer Extinktion von $E_S = 0,5$ (dies entspricht einer 5-Hydroxy-L-tryptophankonzentration von $c = 0,108$ mmol/l) erforderlich, der in Abb. 52 insertiert dargestellt ist. Bei der Messung der Gesamtfluoreszenz von 5-Hydroxy-L-tryptophan-

lösungen mit Konzentrationen unterhalb von $c = 0,108 \text{ mmol/l}$ am TIRF-Rheometer, bewegt man sich aber im Bereich der Nachweisgrenze, an welchem ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis vorliegt, wie **Abb. 24** zeigt. Die Messung der Fluoreszenz von mehreren Standardkonzentrationen unterhalb von $c = 0,108 \text{ mmol/l}$ führt deshalb zu keinem zusätzlichen Erkenntnisgewinn, weshalb im benötigten Bereich (insertierte Graphik in **Abb. 52**) nur zwei Meßpunkte vorhanden sind. Das einfache Verbinden der Meßpunkte ergäbe eine Gerade; ein linearer Zusammenhang besteht aber erst bei sehr hohen Standardkonzentrationen (**Abb. 52**). Um sich der Linearität in diesem niedrigen Konzentrationsbereich zu entheben, wurden die Fluoreszenzkurven (N_s^{tot} - und N_s^s -Kurven in **Abb. 52**) an zweifache hyperbolische Funktionen angepaßt (andere Anpassungen waren nicht möglich). Die insertierte Graphik in **Abb. 52** zeigt auch, daß bei sehr geringen Konzentrationen die gemessene Gesamtfluoreszenz N_s^{tot} überwiegend aus der Fluoreszenz N_s^s des Streulichtes besteht, welche aber zur Berechnung der Oberflächenkonzentration des Proteins nicht brauchbar ist.

Mit Hilfe der Gesamtfluoreszenz der Proteinlösung (N_b^{tot}), die über den Bufferflush (**Abb. 51**) ermittelt wird, kann aus **Abb. 52** der evaneszente Fluoreszenzanteil des in der Bulkphase gelösten Proteins $N_b^{e^\circ}$ abgelesen werden. Da bei Proteinkonzentrationen unterhalb von $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ ein Bufferflush zu keinem markanten Fluoreszenzabfall führt, wurden die $N_b^{e^\circ}$ -Werte (siehe Gl. 98 auf S. 114) für geringe Proteinkonzentrationen extrapoliert. Dies ist erlaubt, da der evaneszente Fluoreszenzanteil linear abhängig von der Protein- bzw. Standardkonzentration ist (siehe **Abb. 52**). Allerdings muß $N_b^{e^\circ}$ durch den Umrechnungsfaktor $f_F = 7,783$ aus **Kap. 3.3.5.2** dividiert werden, da die Entnahme des $N_b^{e^\circ}$ -Wertes aus **Abb. 52** nur erlaubt ist, wenn Gl. 28 erfüllt ist. Für eine gegebene Konzentration des Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan muß die Konzentration der rhBMP-2-Lösung um eben diesen Faktor geringer sein.

Ist die Konzentration der 5-Hydroxy-L-tryptophanlösung um den Faktor $f_F = 7,783$ höher als die Konzentration der rhBMP-2-Lösung, dann besitzen beide Lösungen die gleichen Extinktionen (**Kap. 3.3.5.2**), daß heißt beide Lösungen absorbieren die gleiche Lichtmenge. Werden die gelösten Protein- bzw. Standardmoleküle mit der gleichen Lichtmenge angeregt, emittieren sie Fluoreszenzlicht mit der gleichen Intensität. In **Tab. 13** sind die am TIRF-Rheometer gemessenen Gesamtfluoreszenzen von Standardlösungen (N_s^{tot} , siehe Gl. 22) mit einer Konzentration von $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$ und die über den Bufferflush (**Abb. 51**) bestimmten

Gesamtfluoreszenzen von Proteinlösungen (N_b^{tot} , siehe Gl. 21) mit einer Konzentration von $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ sowie ihre entsprechenden evaneszenten Fluoreszenzanteile N_s^e bzw. $N_b^{e\circ}$, die aus **Abb. 52** abgelesen wurden, für vier Einzelerperimente zusammengestellt.

Tab. 13. Berechnung des Korrekturfaktors f_K aus den Gesamtfluoreszenzen (Bufferflushmethode) mit Gl. 27*

Experiment	rhBMP-2-Lösung		5-Hydroxy-L-tryptophanlösung		Korrekturfaktor f_K
	N_b^{tot} , cps	$N_b^{e\circ}$, cps	N_s^{tot} , cps	N_s^e , cps	
1 (Abb. 51)	$186,2 \pm 16,7$	$38,3 \pm 3,4$	$338,0 \pm 34,0$	$69,8 \pm 7,0$	$0,551 \pm 0,105$
2	$243,4 \pm 29,0$	$40,0 \pm 4,8$	$462,1 \pm 48,6$	$78,3 \pm 8,2$	$0,527 \pm 0,118$
3	$206,6 \pm 21,9$	$36,7 \pm 3,9$	$400,0 \pm 39,8$	$70,7 \pm 7,0$	$0,517 \pm 0,106$
4	$285,0 \pm 25,5$	$48,0 \pm 4,3$	$544,9 \pm 54,0$	$107,3 \pm 10,6$	$0,523 \pm 0,099$
Mittelwert	$230,3 \pm 22,8$	$40,8 \pm 4,1$	$436,3 \pm 43,4$	$81,5 \pm 8,1$	$0,529 \pm 0,107$

* Am TIRF-Rheometer gemessene Gesamtfluoreszenzen von rhBMP-2-Lösungen mit $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ (durch Bufferflush bestimmt) und 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen mit $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$. Es gilt Gl. 28 ($E_s = E_p$), da sich c_p und c_s um den Faktor $f_F = 7,783$ unterscheiden. Mit Gl. 27 folgt der Korrekturfaktor $f_K = 0,529 \pm 0,107$ (Mittelwert). Für das Experiment 1 ist der Bufferflush in **Abb. 51** und die zugehörige Auftragung zur Ermittlung der Fluoreszenzanteile in **Abb. 52** dargestellt. Fehler der Einzelwerte der Fluoreszenzen: $\bar{x} \pm S.E.$. Fehler der einzelnen Korrekturfaktoren: $y \pm \Delta y$ (Gl. 96). Fehler der Mittelwerte: $\bar{x} \pm x_G$ ($n = 4$).

Der Vergleich der Fluoreszenzen von Standard- und Proteinlösungen in **Tab. 13** zeigt, daß die gemessenen Fluoreszenzen der rhBMP-2-Lösungen ($c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$) um den Faktor $f_K = 0,529 \pm 0,107$ kleiner sind als die Fluoreszenzen der 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen ($c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$). Der Korrekturfaktor f_K berücksichtigt das unterschiedliche Fluoreszenz-quenchverhalten von Standard- und Proteinlösungen (in **Abb. 45** ist dagegen das Fluoreszenz-quenchverhalten des adsorbierten Proteins dargestellt). Das Photobleaching konnte wegen der kurzen Meßdauer (2,4 s, blaue Linien in **Abb. 51**) vernachlässigt werden (siehe **Abb. 44**). Der Korrekturfaktor besitzt mit 20 % einen sehr großen relativen Fehler, der aus der starken Streuung der gemessenen Fluoreszenzen (10 %) resultiert. Die Berechnung des Korrekturfaktors über die $N_b^{e\circ}$ - und N_s^e -Werte führt zum Korrekturfaktor $f_K = 0,507 \pm 0,101$ (nicht in **Tab. 13** aufgeführt). Der Unterschied der beiden Korrekturfaktoren ist mit der schlechteren Ablesbarkeit der N_b^e - und N_s^e -Werte aus **Abb. 52** zu erklären.

Zur Berechnung der Oberflächenkonzentrationen des Proteins mit Gl. 36, müssen die in **Abb. 52** abgelesenen evaneszenten Anteile der Fluoreszenzen $N_b^{e\circ}$ (siehe Legende unter **Abb. 52**) sowohl durch den Umrechnungsfaktor $f_F = 7,783$, als auch durch den Korrekturfaktor $f_K = 0,529 \pm 0,107$, entsprechend

$$N_b^e = \frac{N_b^{e\circ}}{f_F \cdot f_K}, \quad (98)$$

dividiert werden. Die mit Gl. 98 berechneten N_b^e -Werte sind in **Tab. 15** aufgeführt.

4.4.2 Berechnung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz von rhBMP-2-Lösungen mit der Kreuzmethode (ohne Bufferflush)

Da, wie im vorangegangenen Kapitel dargelegt, der große Fehler hauptsächlich aus den experimentell ermittelten Bulkphasenfluoreszenzen der Proteinlösungen herrührt, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Verfahren, das sog. Kreuzverfahren, entwickelt, das auf den Einsatz des Bufferflushs ganz verzichtet.

Sowohl die Messung der Extinktionen von 5-Hydroxy-L-tryptophan- und rhBMP-2-Lösungen am Photometer als auch die Messung der Fluoreszenzen beider Lösungen am TIRF-Rheometer, wurden bei derselben Wellenlänge durchgeführt. Insofern werden beide Lösungen auch im Photometer durch das UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt, nur, daß eben diese im Photometer nicht gemessen wird. In beiden Lösungen werden die gleichen Vorgänge ablaufen, die dazu führen, daß im TIRF-Rheometer beim rhBMP-2 nur etwa die Hälfte der Fluoreszenz gemessen wird wie beim Standard, siehe **Tab. 13**.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzbestandteile der rhBMP-2-Bulkphasen wurde ebenfalls von der Auftragung der Fluoreszenzbestandteile der Standardlösungen in **Abb. 52** ausgegangen. Die Entwicklung der Kreuzmethode basiert auf der experimentellen Beobachtung (bei Erfüllung von Gl. 28), daß die Fluoreszenz von rhBMP-2-Lösungen halb so groß ist, wie die Fluoreszenz von 5-Hydroxy-L-tryptophanlösungen. Die Extinktionen beider Lösungen (Protein und Standard) stehen mit dem Korrekturfaktor $f_F = 7,783$ in einem Zusammenhang, welchem in **Abb. 53** durch den Abstand der Vertikalen \overline{AC} und \overline{BD} Rechnung getragen wurde. Eine Überprüfung dieses Verfahrens mit Fibrinogenlösungen führte allerdings nicht zum Erhalt der Fluoreszenzen N_b^{tot} und N_b^e , die durch den Bufferflush experimentell gefunden wurden. Daher muß an dieser Stelle ausdrücklich betont werden, daß die Kreuzmethode nur für rhBMP-2-Lösungen Gültigkeit besitzt.

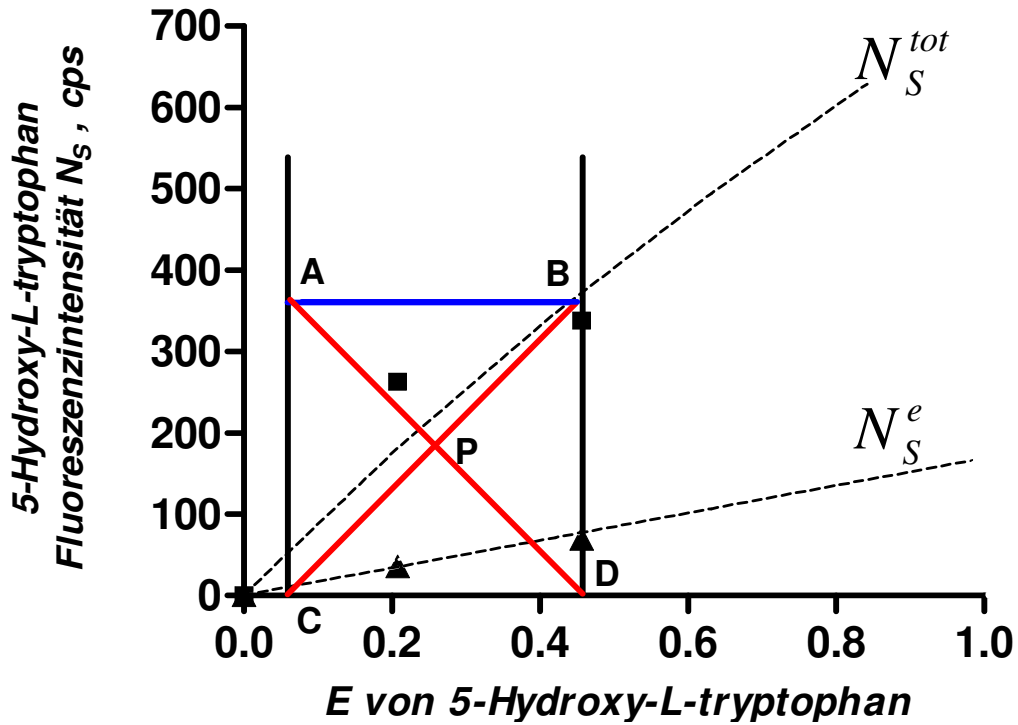


Abb. 53. Kreuzmethode zur Ermittlung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz einer rhBMP-2-Lösung mit $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ ohne Bufferflush. Die Kreuzmethode gilt nachweislich nur für rhBMP-2-Lösungen. N_S^{tot} : Gemessene Gesamtfluoreszenz der Standardlösung (■). N_S^e : evaneszenter Fluoreszenzanteil der Standardlösung (▲). Vertikale \overline{AC} gesetzt in Höhe der Extinktion einer Standardlösung mit $c_s = 12,69 \mu\text{mol/l}$ (entspricht $c_p = 1,630 \mu\text{mol/l}$) $E_s = E_p = 0,059$. Vertikale \overline{BD} gesetzt in Höhe der Extinktion einer Standardlösung mit $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$ (entspricht $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$) $E_s = E_p = 0,457$. c_s und c_p und E_s und E_p sind über f_F miteinander verbunden (**Kap. 3.3.5.2**). Schnittpunkt der Vertikalen \overline{BD} mit der N_S^{tot} -Kurve und der N_S^e -Geraden des Standards ergibt $N_S^{\text{tot}} = 357 \text{ cps}$ und $N_S^e = 77,0 \text{ cps}$ für den Standard mit $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$. Kreuzungspunkt P der Diagonalen \overline{AD} und \overline{BC} ergibt die Gesamtfluoreszenz $N_b^{\text{tot}} = 182,0 \text{ cps}$ des Proteins in der Bulkphase. Lotfällung von dort (P) zur N_S^e -Geraden ergibt den evaneszenten Anteil der Fluoreszenz $N_b^{e\circ} = 42,6 \text{ cps}$ der Proteinlösung. Der Korrekturfaktor ist $f_K = N_b^{\text{tot}} / N_S^{\text{tot}} = 0,510$. Division von $N_b^{e\circ}$ durch $f_F = 7,783$ und f_K (Gl. 98) ergibt die Fluoreszenz N_b^e , die in Gl. 36 eingesetzt wird.

Die **Abb. 53** erklärt die Ermittlung des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz einer Proteinlösung mit $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ mit der Kreuzmethode. Die Gültigkeit dieser Methode wurde für rhBMP-2-Lösungen bestätigt, vergleiche Fluoreszenzen in **Tab. 13** und **14**. Zunächst wurden von Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen, entsprechend **Abb. 24**, die Fluoreszenzen am TIRF-Rheometer gemessen und diese in ihre Anteile entsprechend **Abb. 52** separiert. In Höhe der Extinktion $E_s = 0,059$ der Standardlösung mit $c_s = 12,69 \mu\text{mol/l}$ ist in **Abb. 53** die Vertikale \overline{AC} dargestellt. Sie entspricht einer rhBMP-2-Konzentration von

$c_p = 1,630 \mu\text{mol/l}$, wenn $E_s = E_p$ ist, siehe **Abb. 23**. Die Vertikale \overline{BD} ist in Höhe von $E = 0,457$ für eine Standardkonzentration von $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$, welche einer Proteinkonzentration von $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ entspricht, eingezeichnet. Der Schnittpunkt der Vertikalen \overline{BD} mit der N_s^e -Geraden (**Abb. 53**) ergibt als evaneszenten Fluoreszenzanteil der Standardlösung $N_s^e = 77,0 \pm 1,9 \text{ cps}$ (**Tab. 14**) und der Schnittpunkt mit der N_s^{tot} -Kurve die Gesamtfluoreszenz der Standardlösung $N_s^{\text{tot}} = 357,0 \pm 3,0 \text{ cps}$ (**Tab. 14**), welche an der Ordinate abgelesen werden. Die Fluoreszenzanteile der Proteinlösung ergeben sich, indem die Diagonalen \overline{AD} und \overline{BC} zwischen die beiden Vertikalen \overline{AC} und \overline{BD} gelegt werden. Vom Kreuzungspunkt P in **Abb. 53** ergibt sich die Proteinbulkphasengesamtfluoreszenz $N_b^{\text{tot}} = 182,0 \pm 2,0 \text{ cps}$ (**Tab. 14**) und (durch Lotfällung zur N_s^e -Geraden) der evaneszente Fluoreszenzanteil $N_b^{e^\circ} = 42,6 \pm 1,0 \text{ cps}$ (**Tab. 14**) der Proteinlösung. Für die Experimente 2 bis 4 aus **Tab. 13** sind in **Tab. 14** die Bulkphasenfluoreszenzen angegeben, die nach dem Kreuzverfahren ermittelt wurden. Für das Experiment 1 (**Abb. 53**) ergibt sich mit Gl. 27 aus der Gesamtfluoreszenz der Protein- und der Standardlösung der Korrekturfaktor $f_K = 0,510 \pm 0,008$ (siehe **Tab. 14**).

Tab. 14. Berechnung des Korrekturfaktors f_K aus der Gesamtfluoreszenz (Kreuzmethode) mit Gl. 27*

Experiment	rhBMP-2-Lösung		5-Hydroxy-L-tryptophanlösung		Korrekturfaktor f_K
	N_b^{tot} , cps	$N_b^{e^\circ}$, cps	N_s^{tot} , cps	N_s^e , cps	
1	$182,0 \pm 2,0$	$42,6 \pm 1,0$	$357,0 \pm 3,0$	$77,0 \pm 1,9$	$0,510 \pm 0,008$
2	$224,2 \pm 2,0$	$40,8 \pm 0,3$	$445,0 \pm 3,0$	$75,8 \pm 0,6$	$0,504 \pm 0,008$
3	$219,3 \pm 2,0$	$43,3 \pm 0,5$	$436,0 \pm 3,0$	$78,0 \pm 0,9$	$0,503 \pm 0,007$
4	$228,7 \pm 2,0$	$43,3 \pm 1,0$	$456,0 \pm 3,0$	$79,3 \pm 1,9$	$0,502 \pm 0,008$
Mittelwert	$213,6 \pm 2,0$	$42,5 \pm 0,7$	$423,5 \pm 3,0$	$77,5 \pm 1,3$	$0,504 \pm 0,008$

* Kreuzmethode gilt nur für rhBMP-2-Lösungen. Fluoreszenzen ermittelt aus **Abb. 53**. N_s^{tot} - und N_s^e -Werte als Schnittpunkt der Vertikalen \overline{BD} mit der experimentell ermittelten N_s^{tot} -Kurve bzw. N_s^e -Geraden. N_b^{tot} -Werte als Kreuzungspunkt der Diagonalen \overline{AD} und \overline{BC} . $N_b^{e^\circ}$ -Werte durch Lotfällung vom Kreuzungspunkt zur N_s^e -Geraden. Fehler der Einzelwerte der Fluoreszenzen: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler der einzelnen Korrekturfaktoren: $y \pm \Delta y$ (Gl. 96). Fehler der Mittelwerte: $\bar{x} \pm x_G$ ($n = 4$).

In **Tab. 14** sind die Gesamtfluoreszenzen und die evaneszenten Anteile der Fluoreszenzen von Standard- und Proteinlösungen aufgelistet, die für die Experimente 1 bis 4 aus **Tab. 13** nach dem Kreuzverfahren ermittelt wurden. Die Fehler der Fluoreszenzen sind bei der Kreuzmethode um den Faktor 10 kleiner als beim Bufferflush. Während der experimentelle Ansatz mit der Bufferflush-Methode einen Korrekturfaktor von im Mittel $f_K = 0,529 \pm 0,107$ liefert (**Tab. 13**), führt das Kreuzverfahren zu einem Wert von $f_K = 0,504 \pm 0,008$, der etwa 5 % kleiner ist (Berechnung beider Faktoren über die Gesamtfluoreszenzen N_s^{tot} und N_b^{tot} nach Gl. 27). Wird der Korrekturfaktor mit den evaneszenten Anteile der Fluoreszenzen berechnet, so folgt der Wert $f_K = 0,548 \pm 0,018$ (nicht in **Tab. 14** aufgeführt), der um 8 % größer ist als der Wert $f_K = 0,507 \pm 0,101$ aus der Bufferflushmethode.

Für das Kreuzverfahren müssen lediglich Standardlösungen mit sehr hohen Konzentrationen am TIRF-Rheometer untersucht und die Extinktionen dieser Lösungen mit dem Extinktionskoeffizienten aus **Abb. 23 A** berechnet werden. Die resultierende N_s^e -Gerade weist dadurch einen sehr geringen Fehler auf, der sich in den kleinen Fehlern der N_s^e - und $N_b^{e^o}$ -Werte (siehe **Tab. 14**) widerspiegelt. Die Fehler der Gesamtfluoreszenzen resultieren nur noch aus der Ableseungenauigkeit des Kreuzungspunktes P und den Schnittpunkten der Vertikalen \overline{BD} in **Abb. 53** mit der N_s^{tot} -Kurve bzw. N_s^e -Geraden.

Für andere rhBMP-2-Konzentrationen verschieben sich die Vertikalen \overline{AC} und \overline{BD} auf der Ordinate, ohne daß sich ihr Abstand voneinander ändert. Der Abstand der Vertikalen wird lediglich durch den Extinktionskoeffizienten des Standards und den des Proteins bestimmt und unterscheidet sich beim Protein rhBMP-2 um den Faktor $f_F = 7,783$. Die Horizontale \overline{AB} in **Abb. 53** kann daher willkürlich gelegt werden. Für die Berechnung der Beladungen mit Gl. 36, müssen die über das Kreuzverfahren gefundenen $N_b^{e^o}$ -Werte mit Gl. 98 umgerechnet werden.

4.4.3 Vergleich von Adsorptionskinetiken nach Umrechnung der Fluoreszenzen in die Oberflächenkonzentrationen nach Hlady (Bufferflush) und nach der Kreuzmethode

Die Berechnung der Beladungen erfolgte mit Gl. 36, in welcher die evaneszenten Anteile der Bulkphasenfluoreszenzen, die über die Bufferflushmethode nach Hlady (**Kap. 4.4.1**) bzw. über die Kreuzmethode (**Kap. 4.4.2**) bestimmt wurden, eingesetzt werden. Beide Methoden führen zu unterschiedlichen N_b^e -Werten, die in **Tab. 15** für jede angewandte Proteinkonzentration gegenübergestellt sind. Der Korrekturfaktor f_K wurde bei den N_b^e -Werten, gemäß Gl. 98, berücksichtigt. Die Kreuzmethode gilt nur für rhBMP-2-Lösungen.

Tab. 15. Evaneszente Anteile der Bulkphasenfluoreszenz für Proteinlösungen unterschiedlicher Konzentration.

Konzentration des Proteins ($\mu\text{mol/l}$)	Extinktion der Proteinlösung	N_b^e Bufferflush (cps)	N_b^e graphisch ermittelt, ohne Bufferflush (cps)	Oberflächenkonzentration ($\mu\text{g/cm}^2$) *
0,385	0,0138	$0,28 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,001$
0,481	0,0173	$0,35 \pm 0,07$	$0,41 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,002$
0,962	0,0346	$0,71 \pm 0,14$	$0,82 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,002$
1,73	0,0621	$1,27 \pm 0,26$	$1,48 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,003$
1,92	0,0692	$1,41 \pm 0,29$	$1,65 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,003$
3,45	0,1242	$2,53 \pm 0,51$	$2,95 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,004$
3,85	0,1383	$2,82 \pm 0,57$	$3,29 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,004$
5,77	0,2075	$4,23 \pm 0,86$	$4,94 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,005$
7,69	0,2767	$5,64 \pm 1,14$	$6,58 \pm 0,11$	$0,30 \pm 0,005$
12,69	0,4565	$9,30 \pm 1,88$ **	$10,86 \pm 0,18$	$0,30 \pm 0,005$
19,23	0,6920	$14,10 \pm 2,85$	$16,46 \pm 0,27$	$0,31 \pm 0,006$

Fehler der Fluoreszenzen: $y \pm \Delta y$ (Fehlerfortpflanzungsgesetz) und Oberflächenkonzentrationen: $\bar{x} \pm S.D.$ (Standardabweichung). Fett gedruckte Werte: Adsorptionskinetiken, deren Fluoreszenzen mit den o. a. N_b^e -Werten in die Oberflächenkonzentration umgerechnet wurden, sind in **Abb. 54** dargestellt. * Oberflächenkonzentrationen ($n = 4$), berechnet aus den graphisch ermittelten N_b^e -Werten. ** N_b^e -Wert aus Bufferflush (**Kap.4.4.1**). Mit ihm wurden die anderen N_b^e -Werte dieser Spalte über Dreisatz extrapoliert (es wurde ein relativer Fehler von 20 % angenommen, siehe **Tab. 13**).

In **Tab. 15** sind die berechneten evaneszenten Anteile der Bulkphasenfluoreszenzen für die verwendeten Proteinkonzentrationen aufgeführt. Die N_b^e -Werte, die mit der Kreuzmethode ermittelt wurden, sind um 17 % größer als die Werte, die aus den Bufferflushexperimenten folgen. Der Unterschied liegt daran, daß die Ermittlung der N_b^e -Werte über die Kreuzmethode von den Extinktionen ausgeht, während die N_b^e -Werte beim Bufferflush über die Fluoreszenzen ermittelt werden. Letztere besitzen eine Streuung von 20 % (**Tab. 13**). Im Gegensatz dazu ist die Streuung bei den Fluoreszenzen, die mit der Kreuzmethode (ohne Bufferflush) ermittelt wurden (**Tab. 14**) mit 2 % vernachlässigbar gering.

Mit den N_b^e -Werten aus **Tab. 15** (fettgedruckte Werte) wurden die am TIRF-Rheometer gemessenen Fluoreszenzen für eine Proteinadsorption aus einer rhBMP-2-Lösung mit $c = 3,45 \mu\text{mol/l}$ (siehe Adsorptionskinetik in **Abb. 28** bzw. **31**) mit Gl. 36 in die Oberflächenkonzentrationen umgerechnet. In **Abb. 54** sind die Adsorptionskinetiken unter Berücksichtigung der Fehlergrenzen für die Bufferflushmethode (Kinetiken **A**, **B** und **C**) und für die Kreuzmethode (Kinetiken **D**, **E** und **F**) dargestellt. Die Bleachkonstante (**Tab. 16**) und die Quenchfaktoren (**Abb. 45**) wurden nicht berücksichtigt. Die Meßpunkte wurden zur Wahrung der Übersichtlichkeit fortgelassen.

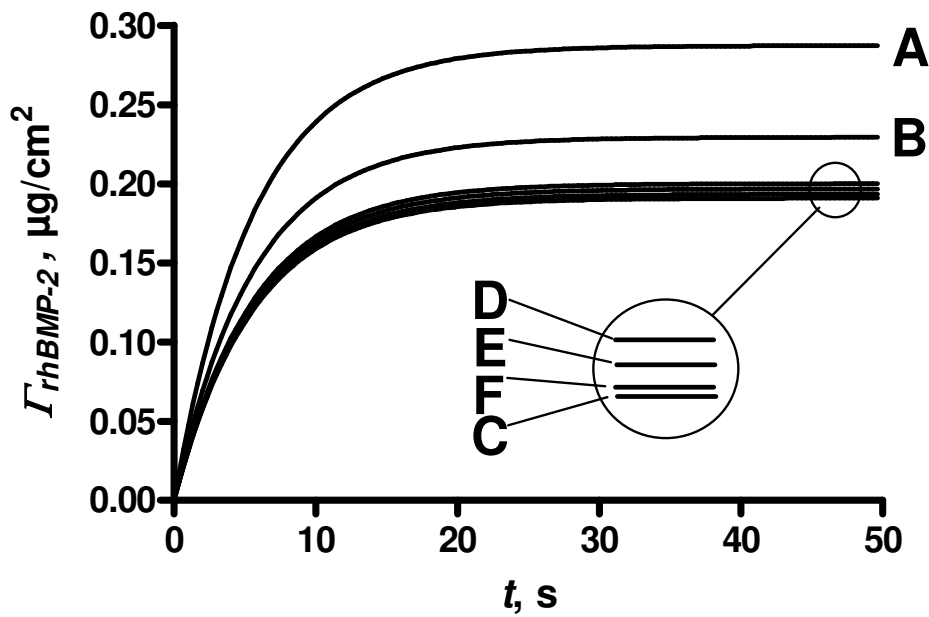


Abb. 54. Anpassungskurven für die Adsorption von rhBMP-2 ($c = 3,45 \mu\text{mol/l}$) an Quarzglas. Experiment aus **Abb. 28** bzw. **31**. Die Kurven stellen Anpassungen an einfache exponentielle Funktionen dar. Die Meßpunkte wurden fortgelassen. Für alle Anpassungen gilt $k_{obs} = 0,1782 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,89 \pm 0,15 \text{ s}$) und $P = 0,956$ ($r^2 = 0,749$). Fehler als Standardfehler. Kurven **A**, **B** und **C**: Berechnung mit N_b^e -Werten aus Bufferflushmethode (**Kap. 4.4.1**). **A**: $N_b^e = 2,02 \text{ cps}$ (untere Fehlergrenze, $\Gamma = 0,29 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 1101 \text{ cps}$). **B**: $N_b^e = 2,53 \text{ cps}$ (ohne Fehlergrenze, $\Gamma = 0,23 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 916 \text{ cps}$). **C**: $N_b^e = 3,04 \text{ cps}$ (obere Fehlergrenze $\Gamma = 0,19 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 731 \text{ cps}$). Kurven **D**, **E** und **F**: Berechnung mit N_b^e -Werten aus Kreuzmethode (**Kap. 4.4.2**). **D**: $N_b^e = 2,90 \text{ cps}$ (untere Fehlergrenze, $\Gamma = 0,20 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 932 \text{ cps}$). **E**: $N_b^e = 2,95 \text{ cps}$ (ohne Fehlergrenze, $\Gamma = 0,20 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 916 \text{ cps}$). **F**: $N_b^e = 3,00 \text{ cps}$ (obere Fehlergrenze, $\Gamma = 0,19 \mu\text{g/cm}^2$, $N_a = 900 \text{ cps}$). N_a : Fluoreszenz beim Vorliegen des apparenten Adsorptionsgleichgewichtes.

Zwar ergeben sich für alle gezeigten Anpassungen in **Abb. 54** die gleichen kinetischen und statistischen Größen ($k_{obs} = 0,1782 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$, $t_{1/2} = 3,89 \pm 0,15 \text{ s}$, $P = 0,956$ und $r^2 = 0,749$), doch sind die Fehler der Oberflächenkonzentrationen, die über die Kreuzmethode ermittelt wurden, mit 2 % deutlich geringer als diejenigen (20 %), die über die Bufferflushmethode ermittelt wurden. Die Anpassungskurven, bei denen die Fluoreszenzen mit den N_b^e -Werten aus der Bufferflushmethode berechnet wurden (Kinetiken **A** bis **C**), liegen sehr weit auseinander. Dies gilt ebenso für die Oberflächenkonzentrationen im apparenten Adsorptionsgleichgewicht. Die Anpassungskurven, bei denen die Fluoreszenzen mit den N_b^e -Werten aus der Kreuzmethode berechnet wurden (Kinetiken **D** bis **E**), liegen fast vollständig übereinander. Dies betrifft auch die apparenten Gleichgewichtbeladungen.

4.4.4 Einfluß des evaneszenten Anteils der Bulkphasenfluoreszenz aus verschiedenen Berechnungsmethoden auf die kinetischen Größen

Die kinetischen Größen wie k_{obs} -Werte und Adsorptionshalbwertszeiten und die statistischen Größen wie P und r^2 werden von der Größe der Fehlergrenzen der N_b^e -Werte nicht beeinflusst. Damit werden auch die Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeiten und die daraus berechneten Bindungskonstanten keine Unterschiede aufweisen. Allerdings sind die relativen Fehler für die Menge des adsorbierten Proteins mit etwa 20 % sehr hoch bei der Bufferflush-Methode. Demgegenüber sind die Fehler mit 2 % vernachlässigbar klein, wenn die adsorbierte Proteinmenge mit der Kreuzmethode ermittelt wird. Aus diesem Grunde wurde die letztgenannte Methode für die Berechnung der Oberflächenkonzentrationen verwendet.

4.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas und an hydrophobem PDLLA

Die Bindungskonstante ist experimentell nicht direkt zugänglich, sondern ergibt sich aus der Division der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante durch die Desorptionsgeschwindigkeitskonstante. Beide Konstanten ergeben sich aus der linearen Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen. In der Auftragung, die der Geradengleichung

$$k_{obs} = k_{on}c_b + k_{off} \quad (72)$$

zugrunde liegt, ist die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} die Steigung und der Achsenabschnitt die Desorptionsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} . Aus Desorptionsexperimenten konnten nur die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{-2} , k_{-3} u.s.w., nicht aber k_{-1} erhalten werden.

4.5.1 Bestimmung der Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas

Die eingesetzten ultrahydrophilen Quarzglasplatten besaßen einen Randwinkel von $\theta_{adv} = 0 \pm 0^\circ$ (Abb. 17 A). Die Rauigkeit der Quarzglasplatten betrug $Ra = 1 \text{ nm}$ [42].

4.5.1.1 Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas

Für die Adsorptionsexperimente von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas wurden Lösungen mit Proteinkonzentrationen zwischen $c = 0,385 \mu\text{mol/l}$ und $c = 12,69 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt (siehe Kap. 3.3.8.4). Mit jeder Konzentration wurden vier Adsorptionsexperimente durchgeführt. In Abb. 35 ist eine typische Adsorptionskinetik dargestellt. Aus den Adsorptionskinetiken wurden die k_{obs} -Werte ermittelt. Zur Ermittlung der interaktionsfreien (siehe [22] und Gl. 58) Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten des Nukleations-Komplexes wurden die k_{obs} -Werte gegen die korrespondierenden Proteinkonzentrationen aufgetragen.

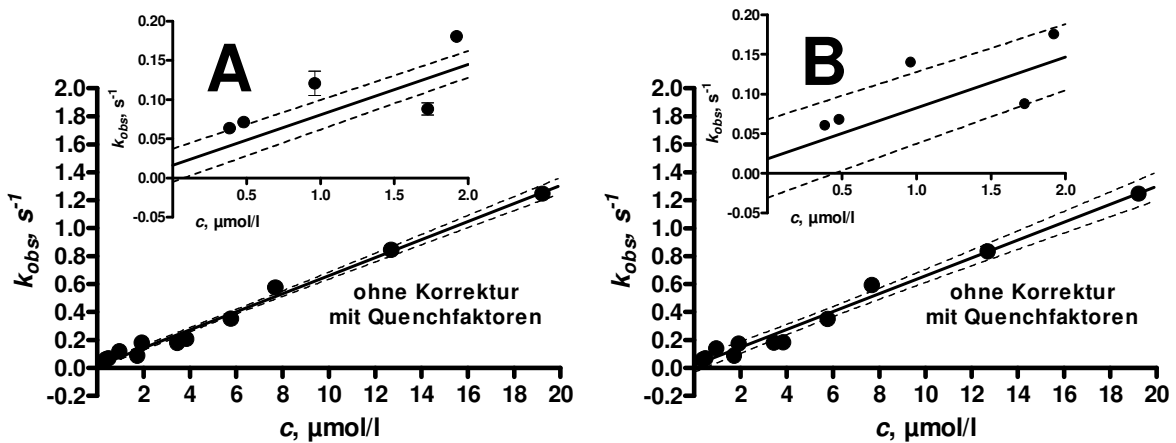


Abb. 55. Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen zur Ermittlung der Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten für die Bindung von rhBMP-2 an Quarzglas. k_{obs} -Werte nicht mit Quenchfaktoren korrigiert. Die insertierten Graphiken zeigen die Regressionsgerade im Bereich des Ursprungs. Gestrichelte Linien: Konfidenzbänder für 95 %. **A:** Durchgezogene Regressionsgerade ($r^2 = 0,972$) resultiert aus der Verwendung aller k_{obs} -Werte (jeweils vier Einzelmessungen je Konzentration). Steigung der Gerade: Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{+1} = 6,44 \pm 0,17 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate: Desorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{-1} = 1,63 \pm 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Bindungskonstante: $K_1' = 4,0 \pm 2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Fehler der Geschwindigkeitskonstanten: $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 42$) und der Bindungskonstante: $y \pm \Delta y$. **B:** Durchgezogene Regressionsgerade ($r^2 = 0,983$) resultiert aus der Verwendung eines k_{obs} -Wertes je Konzentration. Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante: $k_{+1} = 6,40 \pm 0,28 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Desorptionsgeschwindigkeitskonstante: $k_{-1} = 1,85 \pm 2,12 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Bindungskonstante: $K_1' = 3,5 \pm 4,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Fehler der Geschwindigkeitskonstanten: $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$) und Fehler der Bindungskonstante: $y \pm \Delta y$.

In **Abb. 55** sind die k_{obs} -Werte gegen die Konzentrationen der Proteinlösungen aufgetragen. Die k_{obs} -Werte wurden noch nicht mit Quenchfaktoren korrigiert. Die Korrektur der k_{obs} -Werte mit den Photobleachkonstanten wurde ebenfalls nicht berücksichtigt. Die **Abb. 55 A** zeigt die Regressionsgerade ($r^2 = 0,972$), welche aus der Verwendung von vier k_{obs} -Werten je Konzentration entstanden ist. Ihre Steigung entspricht der interaktionsfreien Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 6,44 \pm 0,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Aus dem Achsenabschnitt wurde die interaktionsfreie Desorptionsgeschwindigkeitskonstante $k_{-1} = 1,63 \pm 1,05 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ entnommen. Aus beiden Konstanten wurde die Bindungskonstante $K_I' = 4,0 \pm 2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ berechnet. Die Regressionsgerade aus der Verwendung eines k_{obs} -Wertes je Konzentration ist in **Abb. 55 B** dargestellt. Für die Auftragung in **Abb. 55 B** wurde für jede Konzentration derjenige k_{obs} -Wert ausgewählt, der dem Mittelwert aus vier k_{obs} -Werten in **Abb. 55 A** am nächsten kommt. Aus der Steigung ($r^2 = 0,983$) und dem Achsenabschnitt folgen die Geschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 6,40 \pm 0,28 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 1,85 \pm 2,18 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, aus welchen die Bindungskonstante $K_I' = 3,5 \pm 4,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ berechnet wurde. Es zeigt sich beim Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten aus **Abb. 55 A** mit denjenigen aus **Abb. 55 B**, daß keine signifikanten Unterschiede bestehen. Die Reduktion der Datensätze von vier auf einen je Konzentration wurde durchgeführt, um die später behandelte Korrektur der Adsorptionskinetiken zu vereinfachen. Allerdings führt die Reduktion der Datensätze zu einer Verdopplung des Fehler bei der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten. In beiden Abbildungen zeigen die insertierten Auftragungen den Konzentrationsbereich bis $c = 2 \mu\text{mol/l}$, um den Achsenabschnitt sichtbar zu machen. Dieser liegt sehr nahe bei null. Schon geringe Änderungen der Steigung führen zu großen Änderungen des Achsenabschnittes. Aus diesem Grunde sind die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten mit sehr großen Fehlern behaftet. Die Konvidenzbänder für 95 % (gestrichelte Linien in **Abb. 55 A** und **B**) wurden mit eingezeichnet, da die Fehlerbalken an den Meßpunkten nur sehr klein sind. Jeder k_{obs} -Wert wurde mit den Bleachkonstanten aus **Tab. 16** korrigiert.

Tab. 16. Bleachkonstanten (f_B) aus **Abb. 41** und **42** berechnet.

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Oberflächen- konzentration ($\mu\text{g/cm}^2$)	Adsorptions- halbwertszeit (s)	Bleachkonstante f_B *
0,38	$0,09 \pm 0,001$	$9,4 \pm 0,5$	0,8077
0,48	$0,12 \pm 0,002$	$10,2 \pm 0,7$	0,8077
0,96	$0,12 \pm 0,002$	$7,7 \pm 0,5$	0,8966
1,73	$0,20 \pm 0,003$	$6,3 \pm 0,6$	0,8966
1,92	$0,17 \pm 0,003$	$5,5 \pm 0,5$	0,8966
3,45	$0,22 \pm 0,004$	$3,8 \pm 0,4$	0,9305
3,85	$0,24 \pm 0,004$	$3,2 \pm 0,3$	0,9305
5,77	$0,29 \pm 0,005$	$2,0 \pm 0,5$	0,9499
7,69	$0,30 \pm 0,005$	$1,2 \pm 0,2$	0,9499
12,69	$0,30 \pm 0,005$	$0,83 \pm 0,12$	0,9682
19,23	$0,31 \pm 0,006$	$0,56 \pm 0,11$	0,9864

* Die experimentellen k_{obs} -Werte wurden mit diesen Faktoren multipliziert. Fehler der Oberflächenkonzentration: $\bar{x} \pm S.D.$ ($n = 4$).

Aus **Tab. 16** ist ersichtlich, daß mit zunehmender Proteinkonzentration die Bleachkonstanten dem Wert $f_B = 1$ zustreben (siehe auch **Abb. 42**). In diesem Fall findet keine photochemische Zerstörung der adsorbierten Proteinmoleküle statt, da bei sehr hohen Konzentrationen die Adsorption sehr schnell verläuft, siehe Adsorptionshalbwertszeiten in **Tab. 16**. Die Auftragung (nicht abgebildet) der mit den Bleachkonstanten aus **Tab. 16** korrigierten k_{obs} -Werte (jeweils ein k_{obs} -Wert je Konzentration) gegen die Proteinkonzentrationen ergab die Geschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 6,34 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 4,83 \pm 20,41 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, woraus eine Bindungskonstante von $K_I' = 1,3 \pm 5,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ berechnet wurde. Die Berücksichtigung aller korrigierten k_{obs} -Werte (jeweils vier k_{obs} -Werte je Konzentration, Auftragung nicht abgebildet) führte zu den Geschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 6,34 \pm 0,16 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 3,86 \pm 0,98 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($K_I' = 1,6 \pm 0,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Die Konstanten sind ähnlich groß, egal ob alle oder nur ein k_{obs} -Wert zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten herangezogen wurden. Die Fehler der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich dagegen erheblich voneinander. Die Ermittlung von Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten aus dem Schnittpunkt der Ordinate mit

der Auftragung k_{obs} vs. c wird umso schwieriger, je mehr sie sich dem Ursprung nähert. Zur Berücksichtigung des Fluoreszenzquenchings wurden die Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** korrigiert. Das Photobleaching wurde nicht berücksichtigt, da es in den Quenchfaktoren enthalten ist, siehe **Kap. 4.3.3**. In der folgenden Kinetik ist der sehr starke Einfluß des Fluoreszenzquenchings deutlich zu sehen.

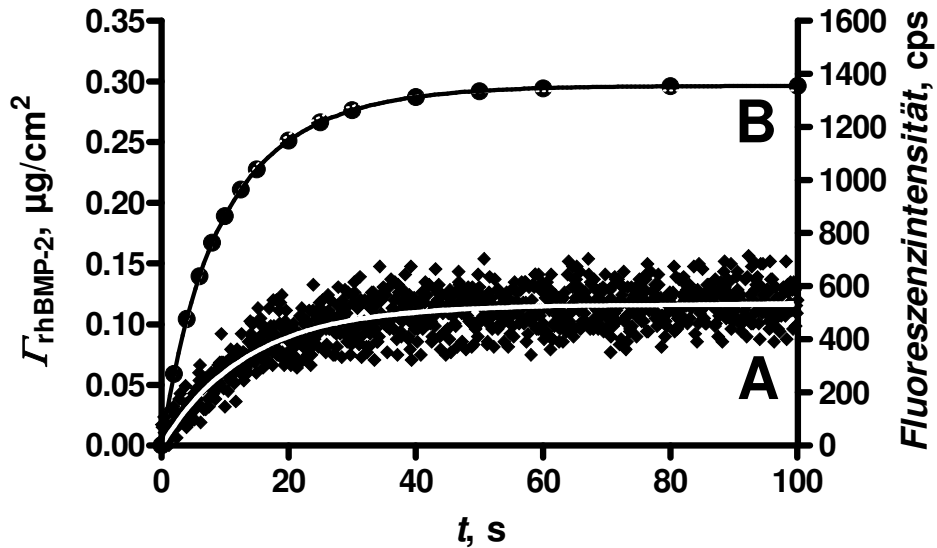


Abb. 56. Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas bei Anwendung einer sehr niedrigen Konzentration ($c = 0,385 \mu\text{mol/l}$). Einleitung der Proteinlösung mit vorangehender Luftblase ($70 \mu\text{l}$). **A:** Kinetik (\blacklozenge) beinhaltet Fluoreszenzquenching und Photobleaching. Anpassung an eine einfache exponentielle Funktion (weiße Kurve). $k_{obs} = 0,0737 \pm 0,0021 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 9,41 \pm 0,54 \text{ s}$) mit $P = 0,964$ ($r^2 = 0,732$). **B:** Kinetik (\bullet) mit Quenchfaktoren (Q) aus **Abb. 45** korrigiert. Anpassung an eine zweifach exponentielle Funktion (schwarze Kurve). Schnelle Adsorptionsphase ($32 \pm 13 \%$): $k_{obs,A} = 0,1929 \pm 0,0018 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,59 \pm 0,07 \text{ s}$) und langsame Adsorptionsphase: ($68 \pm 13 \%$) $k_{obs,B} = 0,0771 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 9,00 \pm 0,09 \text{ s}$). $P = 0,108$ ($r^2 = 1,000$). Linke Ordinate: Oberflächenkonzentration. Rechte Ordinate: Fluoreszenzintensität. Beladung im Adsorptionsgleichgewicht: $\Gamma = 0,12 \pm 0,002 \mu\text{g/cm}^2$ ($N_a = 543 \pm 8 \text{ cps}$) ohne Berücksichtigung von Q (Kinetik A) und $\Gamma = 0,30 \pm 0,01 \mu\text{g/cm}^2$ ($N_a = 1380 \pm 15 \text{ cps}$) mit Berücksichtigung von Q (Kinetik B). Fehler von k_{obs} , $t_{1/2}$ und N_a : $\bar{x} \pm \text{S.E.}$. Fehler von Γ : $y \pm \Delta y$. Fehler der Adsorptionsphasen: $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$). Weitere Versuchsbedingungen siehe **Abb. 35**.

In **Abb. 56** ist eine Adsorptionskinetik dargestellt, bei welcher eine rhBMP-2-Lösung ($c = 0,385 \mu\text{mol/l}$) mit einer vorangehenden Luftblase ($70 \mu\text{l}$) in die Meßzelle eingeleitet wurde. In der Adsorptionskinetik A wurden weder Fluoreszenzquenching noch Photobleaching berücksichtigt. Im Adsorptionsgleichgewicht wurde eine Fluoreszenz von $N_a = 543 \pm 8 \text{ cps}$ gemessen, welche einer Oberflächenkonzentration von $\Gamma = 0,12 \pm 0,002 \mu\text{g/cm}^2$ entspricht.

Die Adsorptionskinetik konnte an eine einfache exponentielle Funktion (weiße Kurve in Kinetik **A**) angepaßt werden. Der Residualwert ist $P = 0,964$ ($r^2 = 0,732$). Die konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante ist $k_{obs} = 0,0737 \pm 0,0021 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 9,41 \pm 0,54 \text{ s}$).

Aus der Anpassungskurve der Kinetik **A** wurden einige Datenpaare (♦) entnommen und mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** korrigiert. Die korrigierten Werte sind in der Kinetik **B** als runde Punkte (●) dargestellt. Diese konnten nur an eine zweifache exponentielle Funktion angepaßt werden (schwarze Kurve in Kinetik **B**). Der Residualwert ist $P = 0,108$ ($r^2 = 1,000$). Durch die zweifach exponentielle Anpassung ergeben sich die beiden konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten $k_{obs,A} = 0,1929 \pm 0,0018 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,59 \pm 0,07 \text{ s}$) und $k_{obs,B} = 0,0771 \pm 0,0003 \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 9,00 \pm 0,09 \text{ s}$), welche auf zwei parallel verlaufende Adsorptionsprozesse mit unterschiedlichen Adsorptionsgeschwindigkeiten hinweisen. Die schnell verlaufende Adsorptionsphase (Index **A**) umfaßt $32 \pm 13 \%$ und die langsam verlaufende Phase (Index **B**) umfaßt $68 \pm 13 \%$ der Adsorptionskinetik. Die Adsorptionsphasenteile wurden als Mittelwert aus allen Adsorptionsexperimenten, unabhängig von der Konzentration der verwendeten Proteinlösungen, angegeben. Die Oberflächenkonzentrationen im Adsorptionsmaximum betrugen $\Gamma_A = 0,21 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und $\Gamma_B = 0,09 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. In der Legende zu **Abb. 56** ist die Summe der Beladungen aufgeführt, welche einer Fluoreszenz von $N_a = 1380 \pm 15 \text{ cps}$ entspricht. Die Auftragungen der $k_{obs,A}$ - bzw. $k_{obs,B}$ -Werte (ein k_{obs} -Wert je Konzentration) gegen die Konzentrationen sind in **Abb. 57** und **58** dargestellt.

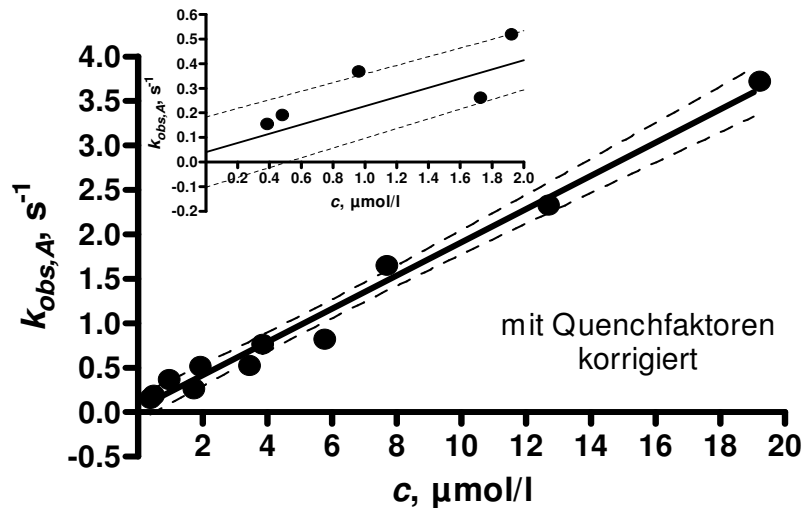


Abb. 57. Auftragung k_{obs} vs. c der schnellen Phase für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas. Bei den Adsorptionsexperimenten umfaßt die schnell verlaufende Phase $39 \pm 11\%$. $k_{obs,A}$ -Werte wurden nach Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus Abb. 45 erhalten. Die insertierte Graphik zeigt den Anstieg der $k_{obs,A}$ -Werte bis zu einer Konzentration von $c = 2 \mu\text{mol/l}$. Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante (Steigung der Regressionsgeraden: $r^2 = 0,984$) $k_{+1A} = 1,87 \pm 0,08 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$). Desorptionsgeschwindigkeitskonstante (Achsenabschnitt): $k_{-1A} = 4,06 \pm 6,31 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$). Bindungskonstante: $K_{1A}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($y \pm \Delta y$). Gestrichelte Linien: Konfidenzbänder für 95%.

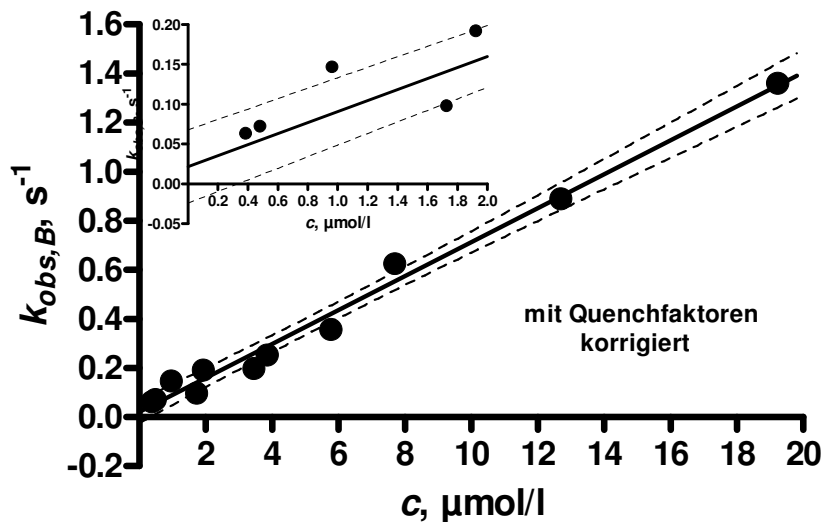


Abb. 58. Auftragung k_{obs} vs. c der langsamen Phase für die Adsorption von rhBMP an Quarzglas. Bei den Adsorptionsexperimenten umfaßt die langsam verlaufende Phase $61 \pm 11\%$. $k_{obs,B}$ -Werte wurden nach Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus Abb. 45 erhalten. Die insertierte Graphik zeigt den Anstieg der $k_{obs,B}$ -Werte bis zu einer Konzentration von $c = 2 \mu\text{mol/l}$. Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante (Steigung der Regressionsgeraden, $r^2 = 0,978$) $k_{+1B} = 6,91 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$). Desorptionsgeschwindigkeitskonstante (Achsenabschnitt): $k_{-1B} = 2,18 \pm 2,04 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ($n = 11$). Bindungskonstante: $K_{1B}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ($y \pm \Delta y$). Gestrichelte Linien: Konfidenzbänder für 95 %.

Die **Abb. 57** und **58** zeigen die Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen. Die k_{obs} -Werte wurden aus Adsorptionskinetiken erhalten, nachdem sie mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** korrigiert wurden. Bei den Adsorptionsexperimenten umfaßte die schnell verlaufende Phase im Mittel $39 \pm 11\%$ und die langsam verlaufende Adsorptionsphase im Mittel $61 \pm 11\%$. Fehlerangaben in Standardabweichung. Die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante der schneller adsorbierenden Phase (**Abb. 57**) ist um den Faktor 2,7 größer als diejenige der langsamer adsorbierenden Phase (**Abb. 58**). Während der relative Fehler der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten nur etwa 4 % beträgt, liegt er bei den Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten mit 155 % (**Abb. 57**) und 94 % (**Abb. 58**) sehr hoch. Die Fehlerstreuung könnte dadurch verringert werden, indem man die Anzahl der Adsorptionsexperimente erhöht. Die Vermessung geringerer Proteinkonzentrationen würde die Fehler ebenfalls verringern, doch ist bei rhBMP-2-Konzentrationen unterhalb von $c = 0,385 \mu\text{mol/l}$ das Signal-Rausch-Verhältnis sehr ungünstig, so daß keine eindeutige exponentielle Anpassung und damit keine exakte Berechnung von k_{obs} -Werten mehr möglich ist. In **Tab. 17** sind die Adsorptions-, Desorptions- und Bindungskonstanten für die Nukleation-Komplexe angegeben, die sich aus der Berücksichtigung bzw. Nichtberücksichtigung der Bleachkonstanten und Quenchfaktoren bei den Adsorptionskinetiken ergeben.

Tab. 17. Adsorptions-, Desorptions- und Bindungskonstanten der Nukleations-Komplexe für die Bindung von rhBMP-2 an Quarzglas mit und ohne Berücksichtigung der Bleachkonstanten f_B und Quenchfaktoren Q .

Korrektur	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante (s^{-1})	Bindungskonstante (M^{-1}) ²
ohne f_B ohne Q^*	$k_{+1} = 6,44 \pm 0,17 \cdot 10^4$	$k_{-1} = 1,63 \pm 1,05 \cdot 10^{-2}$	$K_I' = 4,0 \pm 2,6 \cdot 10^6$
ohne f_B ohne Q^{**}	$k_{+1} = 6,40 \pm 0,28 \cdot 10^4$	$k_{-1} = 1,85 \pm 2,18 \cdot 10^{-2}$	$K_I' = 3,5 \pm 4,1 \cdot 10^6$
mit f_B ohne Q^*	$k_{+1} = 6,34 \pm 0,16 \cdot 10^4$	$k_{-1} = 0,39 \pm 0,10 \cdot 10^{-2}$	$K_I' = 16,3 \pm 5,1 \cdot 10^6$
mit f_B ohne Q^{**}	$k_{+1} = 6,34 \pm 0,26 \cdot 10^4$	$k_{-1} = 0,48 \pm 2,04 \cdot 10^{-2}$	$K_I' = 13,1 \pm 56 \cdot 10^6$
ohne f_B mit Q^{**}	$k_{+1A} = 18,7 \pm 0,8 \cdot 10^4$	$k_{-1A} = 4,06 \pm 6,31 \cdot 10^{-2}$	$K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6$
	$k_{+1B} = 6,91 \pm 0,26 \cdot 10^4$	$k_{-1B} = 2,18 \pm 2,04 \cdot 10^{-2}$	$K_{IB}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6$

* vier Meßwerte je Konzentration und ** ein Meßwert je Konzentration. Erklärung siehe Legende unter **Abb. 55**. Bei den fett gedruckten Konstanten wurde angenommen, daß durch die Berücksichtigung der Quenchfaktoren der Einfluß des UV-Lichtes weitestgehend berücksichtigt wurde. Fehler der Geschwindigkeitskonstanten: $\bar{x} \pm S.D.$. Fehler der Bindungskonstanten: $y \pm \Delta y$.

Die Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Bleachkonstanten (f_B) führt nur zu einer geringen Änderung der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten. Ihre Werte liegen im Bereich von $k_{+1} = 6,34 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{+1B} = 6,91 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten verringern sich durch die Korrektur mit den Bleachkonstanten um den Faktor vier. Die Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** führt zum Erhalt von zwei Konstanten (in **Tab. 17** fett gedruckt), die sich um den Faktor 2,7 voneinander unterscheiden. Die relativen Fehler der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten liegen bei 4 %, unabhängig davon, ob für ihre Berechnung ein Meßwert je Konzentration (Zeilen in **Tab. 17** mit ** gekennzeichnet) oder vier Meßwerte je Konzentration (Zeilen in **Tab. 17** mit * gekennzeichnet) verwendet wurden. Der relative Fehler wird auch nicht durch die Korrektur mit Bleachkonstanten oder Quenchfaktoren beeinflusst. Bei den Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten liegen die relativen Fehler bei wenigstens 100 %, da ihre Ermittlung umso schwieriger wird, je näher man sich am Ursprung befindet. Eine geringe Änderung der Steigung der Auftragung der k_{obs} vs. c führt zu einer starken Änderung des Achsenabschnitts (Desorptionsgeschwindigkeitskonstante). Überdies verdoppelt sich der relative Fehler der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten, wenn nur ein Meßwert je Konzentration untersucht wird.

4.5.1.2 Adsorptionsisothermen für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas

Zur Bestimmung der Oberflächenkonzentrationen im Adsorptionsgleichgewicht (**Kap. 2.8**), wurden alle Adsorptionsexperimente im TIRF-Rheometer durchgeführt. Dies gilt sowohl für die Experimente, bei denen die Fluoreszenz gemessen wurde (im folgenden TIRF-Methode genannt) als auch für die Experimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 (Radioiodmethode). Mit jeder Konzentration wurden mit der TIRF-Methode vier Adsorptionsexperimente durchgeführt. Die Oberflächenkonzentrationen (TIRF-Methode) wurden aus den Fluoreszenzen berechnet. Bei den Fluoreszenzen handelt es sich um unkorrigierte Rohdaten, die nicht mit Bleachkonstanten und Quenchfaktoren korrigiert wurden. Aus monetären Gründen wurde bei der Radioiodmethode für jede Konzentration nur ein Adsorptionsexperiment durchgeführt, da es zur Messung der Radioaktivität erforderlich war, die Quarzglasplatten (100 € je Stück) zu zerbrechen, damit diese in die Meßbehälter gegeben werden konnten (**Kap. 3.3.10**). Die Datensätze (quadratische bzw. runde Punkte in **Abb. 59**) wurden jeweils an hyperbolische Funktionen angepaßt. Die Anpassungen stellen Adsorptionsisothermen dar.

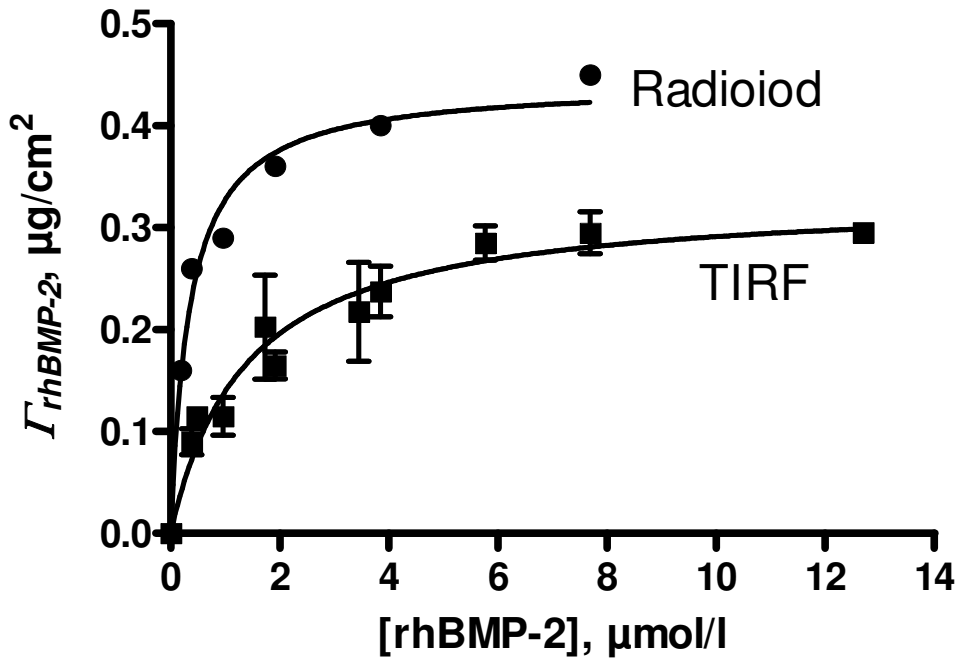


Abb. 59. Adsorptionsisothermen für die Bildung des rhBMP-2-Nukleations-Komplexes an ultrahydrophilem Quarzglas. Beim Nukleations-Komplex bildet das Protein ein Minimum an Bindungen zur Oberfläche aus. TIRF-Methode (■): Oberflächenkonzentrationen berechnet mit Gl. 36 aus den Fluoreszenzen ohne Korrektur mit Bleachkonstanten und Quenchfaktoren. Dissoziationskonstante: $K_D' = 1,38 \pm 0,32 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Fehler als $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ ($n = 44$). Radioiodmethode (●): Dissoziationskonstante: $K_D' = 3,51 \pm 0,68 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$. $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ ($n = 6$). In beiden Fällen wurden die Adsorptionen am TIRF-Rheometer durchgeführt. Durchgezogene Linien: Anpassungen an einfache hyperbolische Funktionen. Die statistischen Daten finden sich in **Tab. 18**. Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

In **Abb. 59** sind zwei Adsorptionsisothermen für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas dargestellt. Über die TIRF-Methode wurde die Dissoziationskonstante $K_D' = 1,38 \pm 0,32 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Die Meßpunkte (■) sind Mittelwerte aus vier Einzelmessungen je Konzentration. Über die Radioiodmethode (●, nur ein Meßwert je Konzentration) wurde die Dissoziationskonstante $K_D' = 3,51 \pm 0,68 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ gefunden. Die durchgezogenen Kurven stellen Anpassungskurven an einfache hyperbolische Funktionen dar. Die Oberflächenkonzentrationen, die aus den Fluoreszenzen berechnet wurden, liegen deutlich unterhalb derjenigen, die mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 ermittelt wurden. Die statistischen Größen für die einzelnen Anpassungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 18. Statistische und kinetische Daten aus der Anpassung der Adsorptionsisothermen in **Abb. 59** für die Bindung von rhBMP-2 an Quarzglas

statistische Parameter	hyperbolische Funktion für eine einseitige Bindung	
	TIRF	Radioiod (Kontrolle)
Beladung im Sättigungsgleichgewicht [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	$0,33 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,02$
Bindungskonstante K_f [M^{-1}]	$7,3 \pm 1,7 \cdot 10^5$	$2,9 \pm 0,5 \cdot 10^6$
Korrelationskoeffizient r^2	0,779	0,979
Residualwert P	0,217	0,300
Signifikanz vom Anpassungsmodell	nein	nein

Bindungskonstante: $1/K_D'$. $\bar{x} \pm S.E.$ Für die TIRF-Isotherme ist $n = 44$ und für die Radioiodisotherme ist $n = 6$.

Wie aus der **Tab. 18** zu erkennen ist, findet man bei der Radioiodmethode eine deutlich höhere Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht als bei der TIRF-Methode. Da die photochemische Zerstörung bei schnellen Adsorptionskinetiken kaum eine Rolle spielt (siehe **Tab. 17**), muß für diesen Unterschied das Fluoreszenzquenching verantwortlich sein. Beide Anpassungen in **Abb. 59** stimmen mit dem gewählten Anpassungsmodell für eine Bindungsstelle überein.

4.5.1.3 Fluoreszenzverlust bei der Desorption von rhBMP-2 in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich der Fluoreszenzverlust von rhBMP-2 ändert, wenn eine Vorinkubation über 500 s bzw. 19 h erfolgt (**Kap. 3.3.8.5**). Die Elution erfolgte mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$). Beide Kinetiken wurden auf 100 % normiert. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt.

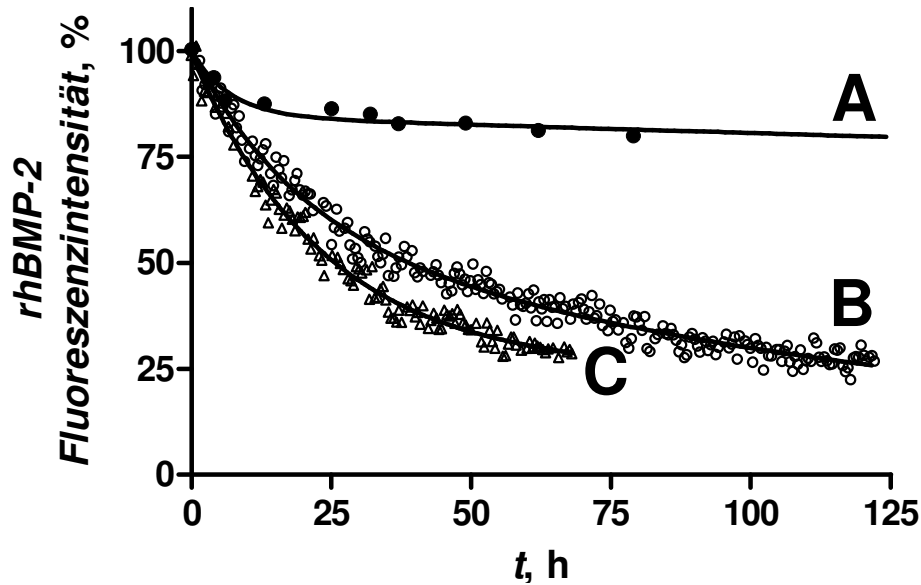


Abb. 60. Fluoreszenzverlust nach Gleichgewichtseinstellung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$, PBS, $\text{pH} = 7,4$) über 500 s und 19 h. **A** (●): Das Kontrollexperiment mit ^{125}I -rhBMP-2 ist die Kinetik **B** aus **Abb. 50** nach Vorinkubation über 19 h. Startbeladung $\Gamma = 0,30 \mu\text{g/cm}^2 = 100 \%$. Span1: 15 %, Span2: 85 % (kinetische und statistische Daten, siehe Legende unter **Abb. 50**). **B** (○): Desorption nach Vorinkubation über 500 s (Kinetik **A** aus **Abb. 48**). Startbeladung $\Gamma = 0,24 \mu\text{g/cm}^2 = 100 \%$. Span1: 43 %, Span2: 57 % . Belichtungsrate 21 s/h. (kinetische und statistische Daten, siehe Legende unter **Abb. 48**). **C** (Δ): Desorption nach Vorinkubation über 19 h (Kinetik **A** aus **Abb. 50**). Startbeladung $\Gamma = 0,23 \mu\text{g/cm}^2 = 100 \%$. Span1: 74 %, Span2: 26 %. Belichtungsrate 21 s/h. (kinetische und statistische Daten, siehe Legende unter **Abb. 50**). Geschwindigkeitskonstanten, siehe nachfolgenden Text. $\bar{x} \pm \text{S.E.}$

In **Abb. 60** sind drei Kinetiken ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$) dargestellt, die jeweils an eine zweifache exponentielle Funktion angepaßt wurden. Für die folgenden Betrachtungen wurden Photo-bleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt. Die Kinetik **A** (●) ist das Kontrollexperiment (Kinetik **B** aus **Abb. 50**) mit radioaktivem ^{125}I -rhBMP-2. Die Desorptionsgeschwindigkeiten sind $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 4,7 \pm 1,4 \text{ h}$) und $k_{-3} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 60,3 \pm 7,1 \text{ d}$) und wurden nach einer Vorinkubation über 19 h gefunden. Das Experiment **C** (Δ) erfolgte ebenfalls nach einer Vorinkubation über 19 h und wurde aus der **Abb. 50** (Kinetik **A**) entnommen. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 16,4 \pm 0,6 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 56,3 \pm 20,1 \text{ d}$) wurden bei einer Belichtungsrate von 21 s/h gemessen. Das Experiment **B** (○) wurde aus **Abb. 48** (Kinetik **A**) entnommen. Die Geschwindigkeitskonstanten sind $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 13,2 \pm 1,3 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 105,1 \pm 8,1 \text{ h}$), bei welchem die Vorinkubation 500 s dauerte. Gemessen wurde es bei einer Belichtungsrate von 21 s/h. Ein Radioiodexperiment nach einer Gleichgewichtseinstellung über 500 s wurde nicht durchgeführt (siehe **Kap. 3.3.11** und **4.3.5**).

Die Verlängerung der Vorinkubationsdauern von 500 s (Kinetik **B** in **Abb. 60**) auf 19 h (Kinetik **C** in **Abb. 60**) führt kaum zu einer Änderung der Geschwindigkeitskonstanten bei der schneller desorbierenden Spezies, so daß $k_{-2}^{\beta} \approx k_{-2}^{\alpha}$ ist. Es wurde angenommen, daß es sich um die gleichen adsorbierten rhBMP-2-Spezies handelt. Daher wurden die beiden Konstanten k_{-2}^{β} und k_{-2}^{α} zu $k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ gemittelt. Die Ausdehnung der Dauer der Vorinkubation von 500 s auf 19 h führt jedoch dazu, daß sich die schneller desorbierende rhBMP-2-Spezies auf der Oberfläche von 43 % (Kinetik **B** in **Abb. 60**) auf 74 % (Kinetik **C** in **Abb. 60**) anreichert. Der Vergleich der gemittelten Geschwindigkeitskonstante $k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ der schnell desorbierenden rhBMP-2-Spezies mit $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ aus dem Kontrollexperiment (Kinetik **A** in **Abb. 60**) zeigt einen Unterschied um den Faktor $f_0^{21} = 3,119^*$.

Die Geschwindigkeitskonstante der langsam desorbierenden rhBMP-2-Spezies verringert sich dagegen bei Ausdehnung der Vorinkubationsdauern von 500 s (Kinetik **B** in **Abb. 60**) auf 19 h (Kinetik **C** in **Abb. 60**) erheblich von $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ auf $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ um den Faktor $f_l = 0,078$, welcher als Umrechnungsfaktor bezeichnet werden soll.

Zur Unterscheidung der Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ von $k_{-3}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ wird für letztere zunächst $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, und da sich $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **C** in **Abb. 60**), abgesehen vom Fehler, nicht wesentlich von $k_{-3} = k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A** in **Abb. 60**) unterscheidet, schließlich $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ geschrieben. In den weiteren Betrachtungen wurde sich für die Fehlergrenze $\pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ und nicht $\pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ entschieden, da sich die Desorption im ersten Fall über einen deutlich längeren Zeitraum erstreckte (vergleiche Kinetiken in **Abb. 50**).

4.5.1.4 Fluoreszenzverlust bei der Desorption von rhBMP-2 in Abhängigkeit vom Elutionspuffer

Die folgenden beiden Experimente (**Abb. 61**) ergeben sich aus der Verwendung unterschiedlicher Elutionspuffer. Vor den Experimenten erfolgte eine Vorinkubation über jeweils 500 s in rhBMP-2-Lösung ($pH = 4,5$) und danach in PBS-Puffer ($pH = 7,4$) (beide ohne Durchfluß, siehe **Abb. 40**). Die Experimente wurden bei einer Belichtungsrate von 124 s/h (**Kap. 3.3.8.5**) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$) und mit NaAc-

* In **Kap. 4.3.5** ist ein Faktor von $f_0^{21} = 3,475$ angegeben, für welchen k_{-2} durch k_{-2}^{α} dividiert wurde und nicht wie hier k_{-2} durch $k_{-2}^{\#}$.

Puffer ($pH = 4,5$). Bei den Untersuchungen wurde nicht weiter differenziert, ob die Variation des pH -Wertes, die Zusammensetzung des Puffers oder beide Parameter entscheidend sind. Bei den Geschwindigkeitskonstanten wurde das Photobleaching und Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt, weshalb die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten mit dem Index γ gekennzeichnet wurden (siehe **Kap. 4.3.5**).

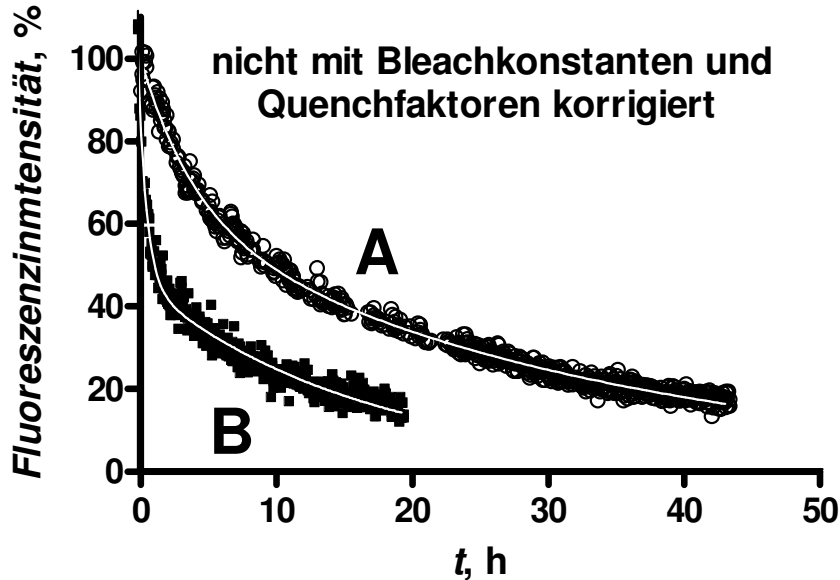


Abb. 61. Fluoreszenzverlust des adsorbierten rhBMP-2 ($3,85 \mu\text{mol/l}$) bei der Elution mit PBS- ($pH = 7,4$) und Natriumacetatpuffer ($pH = 4,5$). Vor den Experimenten erfolgte über 500 s eine Vorinkubation in Proteinlösung und dann über 500 s in PBS-Puffer (siehe **Abb. 40**). Beide Kinetiken wurden an eine zweifach exponentielle Funktion angepaßt (weiße Kurven). Belichtungsrate: 124 s/h. Durchflußrate: $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$. Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurden nicht berücksichtigt. **A** (\circ): Elution mit PBS-Puffer (Kinetik **B** aus **Abb. 48**) $k_{-2}^{\gamma} = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,1 \pm 0,1 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\gamma} = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24,3 \pm 0,5 \text{ h}$). Span1: 44 %. Span2: 56 %. (Statistische Größen, siehe Legende unter **Abb. 48**). 100 % = 1886 cps. **B** (\bullet): Elution mit NaAc-Puffer. $k_{-2}^{\gamma} = 4,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 25,3 \pm 1,0 \text{ min}$) und $k_{-3}^{\gamma} = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 11,1 \pm 0,2 \text{ h}$). Span1: 55 % und Span2: 45 %. 100 % = 1308 cps. $\bar{x} \pm \text{S.E.}$

Dargestellt sind in **Abb. 61** zwei Desorptionskinetiken bei der die Elution mit verschiedenen Puffern erfolgte. Das Photobleaching und Fluoreszenzquenching wurde nicht berücksichtigt. Die Kinetik **A** (\circ) zeigt die Desorption unter Verwendung von PBS-Puffer. Hieraus ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 3,1 \pm 0,1 \text{ h}$) und $k_{-3}^{\gamma} = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24,3 \pm 0,5 \text{ h}$). Bei der Desorption mit NaAc-Puffer, siehe Kinetik **B** (\bullet) in **Abb. 61**, ergeben sich die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 4,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 25,3 \pm 1,0 \text{ min}$) und $k_{-3}^{\gamma} = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 11,1 \pm 0,2 \text{ h}$). Die Kinetik wurde an eine zweifache exponentielle Funktion ($r^2 = 0,968$) angepaßt (weiße Kurve). Der Residual Runs

Test ergibt einen Residualwert von $P = 0,146$. Die Verwendung von NaAc-Puffer führt dazu, daß im schnell verlaufenden Anteil der Kinetik die Freisetzung 7,35 mal so schnell erfolgt wie bei der Verwendung von PBS-Puffer. Im langsam verlaufenden Anteil der Kinetik erfolgt die Desorption mit einer um den Faktor 2,19 höheren Geschwindigkeit. Bei der Elution mit NaAc-Puffer beträgt der Anteil der schnell desorbierenden Spezies 55 % und bei Elution mit PBS-Puffer 43 %.

4.5.2 Bestimmung der Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLA

Bisher liegen noch keine Bindungsstudien für rhBMP-2 an PDLA-Oberflächen (**Kap. 3.3.4.4**) vor. Die PDLA-Oberfläche besitzt einen Randwinkel von $\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$ (**Tab. 3**).

4.5.2.1 Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLA

Für die Adsorptionsexperimente wurden Proteinlösungen mit Konzentrationen zwischen $c = 1,92 \mu\text{mol/l}$ bis $c = 17,88 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt (**Kap. 3.3.8.4**). Mit jeder Konzentration wurden drei Adsorptionsexperimente am TIRF-Rheometer durchgeführt. Eine Adsorptionskinetik ist in **Abb. 38** abgebildet. Die Adsorptionskinetiken wurden mit den Bleachkonstanten aus **Tab. 19** korrigiert. Alle Adsorptionskinetiken konnten an einfache exponentielle Funktionen angepaßt werden.

Tab. 19. Bleachkonstanten (f_B) für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas, berechnet aus **Abb. 41** und **42** und N_b^e -Werte zur Berechnung der Oberflächenkonzentrationen. *

Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Adsorptions-halbwertszeit (s)	Bleachkonstante f_B	N_b^e -Werte
1,92	$7,8 \pm 0,5$	0,8966	$1,65 \pm 0,03$
3,85	$5,0 \pm 0,3$	0,8966	$3,29 \pm 0,05$
9,00	$2,7 \pm 0,2$	0,9305	$7,70 \pm 0,13$
11,54	$1,9 \pm 0,2$	0,9499	$9,88 \pm 0,17$
15,38	$1,6 \pm 0,1$	0,9530	$13,16 \pm 0,22$
17,88	$1,3 \pm 0,2$	0,9682	$15,30 \pm 0,26$

* Die experimentellen k_{obs} -Werte wurden mit den Bleachkonstanten aus dieser Tabelle korrigiert. Die N_b^e -Werte wurden nach dem Kreuzverfahren (**Abb. 53**) berechnet. Fehler Adsorptionshalbwertszeiten: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler der N_b^e -Werte: $y \pm \Delta y$.

Wie **Tab. 19** zeigt, streben die Bleachkonstanten mit zunehmender Proteinkonzentration dem Wert $f_B = 1$ zu. Der Zusammenhang zwischen Bleachkonstanten und den Proteinkonzentrationen ist in **Abb. 42** für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas dargestellt. Die Adsorptionskinetiken konnten alle an einfache exponentielle Funktionen angepaßt werden. Die Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen (**Abb. 62**) führt zu den interaktionsfreien Geschwindigkeitskonstanten des Nukleations-Komplexes.

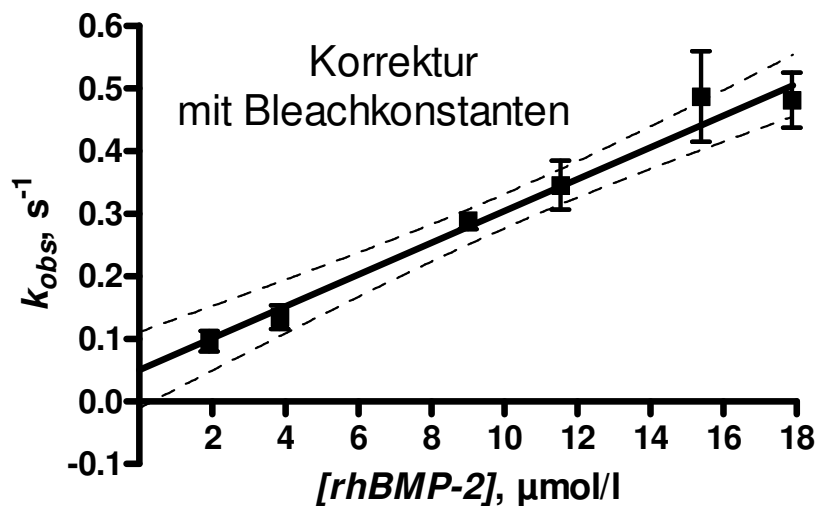


Abb. 62. Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen zur Ermittlung der Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten für die Bindung von rhBMP-2 an PDLLA. k_{obs} -Werte wurden mit den Bleachkonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas korrigiert (**Abb. 42**). $r^2 = 0,794$. Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten: $k_{+1} = 2,56 \pm 0,27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 6,61 \pm 3,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Bindungskonstante: $K_1' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Ohne Korrektur mit Bleachkonstanten ergeben sich die Sorptionskonstanten $k_{+1} = 2,54 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 5,01 \pm 2,95 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (nicht abgebildet). Bindungskonstante: $K_1' = 5,1 \pm 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Fehler Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten: $\bar{x} \pm S.D.$ ($n = 6$) und Fehler der Bindungskonstante: $y \pm \Delta y$. Gestrichelte Linien: Konfidenzbänder für 95 %.

Die **Abb. 62** zeigt die lineare ($r^2 = 0,794$) Abhängigkeit der k_{obs} -Werte von den rhBMP-2-Konzentrationen. Die k_{obs} -Werte wurden mit den Bleachkonstanten aus **Tab. 19** korrigiert. Aus **Abb. 62** ergeben sich die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 2,54 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 5,01 \pm 2,95 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Ohne Korrektur mit den Bleachkonstanten folgen aus der Auftragung k_{obs} vs. c (ohne Abbildung) die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{+1} = 2,56 \pm 0,27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-1} = 6,61 \pm 3,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Eine Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren analog **Abb. 56** erfolgte nicht, da aus monetären Gründen kein Kontrollexperiment zur Ermittlung der Quenchfaktoren durchgeführt wurde. Die

folgende Übersicht faßt alle kinetischen Größen für die Bindung des rhBMP-2-Nukleations-Komplexes an PDLLA zusammen.

Tab. 20. Gegenüberstellung von Adsorptions-, Desorptions- und Bindungskonstanten der Nukleations-Komplexe für die Bindung von rhBMP-2 an PDLLA..

Korrektur	Adsorptions- geschwindigkeits- konstante ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Desorptions- geschwindigkeits- konstante (s^{-1})	Bindungskonstante (M^{-1})
ohne f_B ohne Q	$2,54 \pm 0,26 \cdot 10^4 *$	$5,01 \pm 2,95 \cdot 10^{-2} *$	$K_I' = 5,1 \pm 3,5 \cdot 10^5 *$
mit f_B ohne Q	$2,56 \pm 0,27 \cdot 10^4 *$	$6,61 \pm 3,13 \cdot 10^{-2} *$	$K_I' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5 *$
ohne f_B ohne Q	-	-	$K_I' = 4,9 \pm 2,4 \cdot 10^5 **$

* Werte aus der Auftragung k_{obs} vs. c (**Abb. 62**). Fehler der Geschwindigkeitskonstanten: $\bar{x} \pm S.D.$ ($n = 26$). Fehler der Bindungskonstanten $y \pm \Delta y$. ** Wert aus Adsorptions-isotherme (**Abb. 63**). Fehler der Bindungskonstante: $\bar{x} \pm S.E.$ ($n = 26$).

Wie bei der Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas, führt die Korrektur mit den Bleachkonstanten (f_B) zu keiner signifikanten Änderung bei den Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten sowie den Bindungskonstanten (siehe **Tab. 20**).

4.5.2.2 Isotherme für die apparente Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLLA am TIRF-Rheometer

Die Isotherme (**Abb. 63**) für die apparente Adsorption von rhBMP-2 an PDLLA resultiert aus der Anpassung der Gleichgewichtsbeladungen (schwarze Punkte in **Abb. 63**) an eine einfache hyperbolische Funktion. Da weder Photobleaching noch Fluoreszenzquenching berücksichtigt wurden, handelt es sich um apparente Adsorptionsvorgänge. Da keine Adsorptionsexperimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 auf einer PDLLA-Oberfläche durchgeführt wurden (**Kap. 4.5.2.1**), konnte keine Korrektur mit Quenchfaktoren vorgenommen werden.

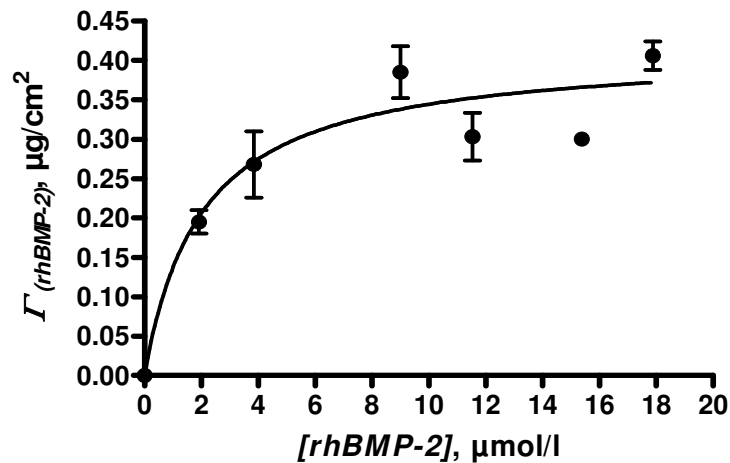


Abb. 63. Adsorptionsisotherme für die apparente Adsorption von rhBMP-2 an PDLLA. Oberflächenkonzentrationen berechnet mit Gl. 36 aus den N_b^{e*} -Werten (Tab. 19) aus der Kreuzmethode. Die Linie zeigt die Anpassungskurve ($P = 0,118$, $r^2 = 0,538$) an eine einfache hyperbolische Funktion. Beladung im Sättigungsgleichgewicht: $\Gamma_s = 0,41 \pm 0,04 \cdot 10^4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Dissoziationskonstante: $K_D' = 2,02 \pm 0,97 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Fehler als $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ ($n = 26$). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen.

Aus der Adsorptionsisotherme in **Abb. 63** ergibt sich die Bindungskonstante ($1/K_D'$) $K_I' = 4,9 \pm 2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Sie entspricht der Bindungskonstante aus der Auftragung der k_{obs} -Werte vs. c (siehe **Tab. 20**).

4.5.2.3 Fluoreszenzverlust bei der apparenten Desorption des rhBMP-2 von hydrophobem PDLLA

Für die Elution des adsorbierten rhBMP-2 wurde PBS-Puffer ($pH = 7,4$) verwendet. Eine längere Beobachtung der Fluoreszenz war nicht möglich, da sich das immobilisierte PDLLA nach knapp 30 Stunden von der Quarzglasplatte ablöste. Ein Kontrollexperiment mit radioaktivem ^{125}I -rhBMP-2 wurde nicht durchgeführt. Es wurde der Begriff *apparent* verwendet, da das Fluoreszenzquenching nicht berücksichtigt wurde.

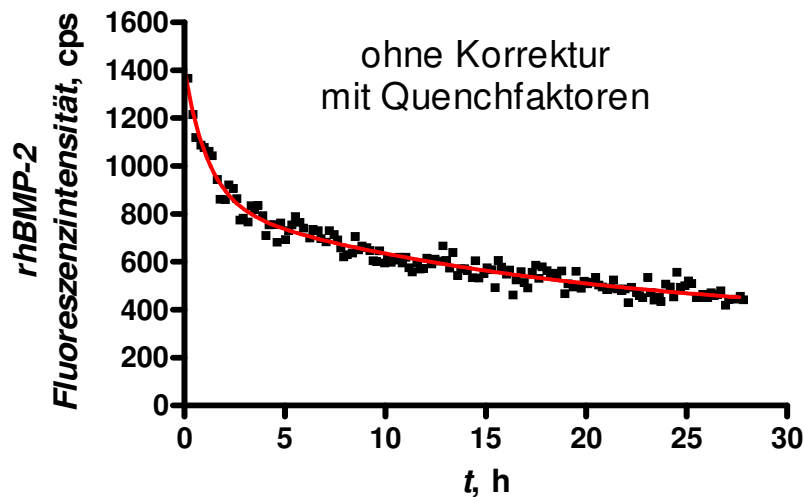


Abb. 64. Fluoreszenzverlust bei der apparenten Desorption des rhBMP-2 von PDLLA. Die Kinetik wurde an eine zweifache exponentielle Funktion ($P = 0,144$, $r^2 = 0,960$ angepaßt (rote Kurve). Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 2,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 48,6 \pm 5,4 \text{ min}$) und $k_{-2}^{\gamma} = 1,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 12,1 \pm 0,5 \text{ h}$) beinhalten Photobleaching und Fluoreszenzquenching. Die Vorinkubation dauerte 500 s. Belichtungsrate: 124 s/h. Durchflußrate: $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$. Fehler als $\bar{x} \pm S.E.$

Die apparente Desorption von rhBMP-2, welches an immobilisiertem PDLLA gebunden wurde, ist in **Abb. 64** dargestellt. Die Kinetik konnte an eine zweifache exponentielle Funktion ($r^2 = 0,960$) angepaßt werden. Der Residual Runs Test ergab den Residualwert $P = 0,144$. Aus der Kinetik wurden die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 2,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 48,6 \pm 5,4 \text{ min}$) und $k_{-2}^{\gamma} = 1,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 12,1 \pm 0,5 \text{ h}$) entnommen. Da die Fluoreszenz bei dem Experiment bei einer Belichtungsrate von 124 s/h gemessen wurde, sind die Geschwindigkeitskonstanten durch das Fluoreszenzquenching und Photobleaching verfälscht.

5. Diskussion

5.1 Ausbildung von Nanoschichten an verschiedenen Oberflächen und exponentiell verlaufende Adsorptionen

Die Messung der Bindungskinetiken von Makromolekülen an ebenen Oberflächen mit optischen Biosensoren, die die evaneszente Welle und die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) nutzen, ist von großer Bedeutung in der Biotechnologie [22]. Für hochaffine Oberflächen und Moleküle mit großer molarer Masse, wie Proteine oder DNA, ist der Massentransport zur Oberfläche durch die Nernstsche Diffusionsschicht [34] der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und verfälscht die tatsächliche Adsorptionsgeschwindigkeit. Für eine BIAcore-

Durchflußzelle wird als Dicke für die Nernstsche Diffusionsschicht der Wert von 10 μm angegeben [188]. Bei der Adsorption findet in der oberflächennahen Flüssigkeitsschicht eine Konzentrationsverarmung (Depletion) statt, da die Adsorptionsgeschwindigkeit größer ist als die Transportgeschwindigkeit (Diffusion) zur Oberfläche. Bei der Messung von Adsorptionskinetiken ist es von entscheidendem Interesse, diese Transportlimitierung zu beseitigen oder zu reduzieren. Bei transportlimitierten Adsorptionen ist zur Berechnung der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten die Kenntnis von sieben Parametern (D , c_0 , Γ_{max} , α , β , δ_N und k_{off}) erforderlich [22], deren Bestimmung teilweise einen erheblichen experimentellen Aufwand erfordert. Lin und Hlady [31] entwickelten ein Programm, um mit den vorgenannten Parametern der Correl-Gleichung für den transportlimitierten Fall (Gl. 62 bis Gl. 64) die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten zu berechnen. Ohne diese Parameter kommt dagegen der Global Fit [18,30,235] aus, wobei die Frage erlaubt sein sollte, ob die durch den Global Fit erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten tatsächlich den reaktionslimitierten Fall beschreiben, wie dies bei exponentiell verlaufenden Adsorptionen der Fall ist. Der Global Fit wird umgangen, indem bei der Einleitung der Proteinlösung eine vorangehende Luftblase verwendet wird [22,40,41].

Für die Beseitigung oder Reduktion des Massentransportes sind in [22] einige Methoden mitsamt ihren Nachteilen zusammengestellt. So wird dort z. B. die Beseitigung einer glatten Oberfläche durch Aufbringen von Partikeln erwähnt, wobei die Analyse in Echtzeit erschwert wird. Die Verringerung der Anzahl von Bindungsstellen auf der Oberfläche führt zu einer Verringerung der Adsorptionsgeschwindigkeit [18], doch geht dies mit der Reduktion der Sensitivität einher. Eine Erhöhung der Scherrate führt nur zu einer ungenügenden Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht. So wurde die Nernstsche Diffusionsschicht bei der Adsorption von Fibrinogen an Quarzglas im Anwendungsbereich von Scherraten zwischen $\gamma = 850$ und 5000 s^{-1} von 25 μm [22] auf 8,5 μm [146] reduziert. Durch die Reduktion der Meßzellendicke auf bis zu 20 μm [236], also bis innerhalb des Bereiches der Nernstschen Diffusionsschicht, wird versucht, den Diffusionsweg und damit die Transportlimitierung zu verringern. Als Nachteil tritt häufig eine Verstopfung der Meßzelle auf. Alle Methoden eint, daß die Transportlimitierung nicht signifikant reduziert wird.

Die erfolgreiche Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht auf 200 nm wurde erstmals im Jahre 1999 von Jennissen und Zumbrink [40,41] beschrieben. Ihre Untersuchungen führten sie mit den Proteinen Phosphorylase *b* [40] und Fibrinogen [22,40,42] an ultrahydrophilem Quarzglas an einem TIRF-Rheometer [21] durch. Die Beseitigung der Transportlimitierung erreich-

ten sie, indem sie die Proteinlösung mit einer vorangehenden Luftblase in die Meßzelle einleiteten, wobei exponentiell verlaufende Adsorptionskinetiken beobachtet wurden. Das als BLEB-Methode (BLEB: Boundary Layer Exchange by Bubble [42]) bezeichnete Verfahren, wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des nichtadsorbierenden Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan und des Proteins rhBMP-2 am TIRF-Rheometer verwendet. Bei Adsorptionsexperimenten von Avidin-FITC an immobilisiertem Biotin am TIRF-Rheometer (die Proteinlösung wurde ebenfalls mit einer Luftblase in die Meßzelle eingeleitet), wurden in [237] erstmals transportlimitierungsfreie Adsorptionskinetiken beschrieben, die an zweifach exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten.

Ohne Anwendung einer Luftblase verläuft die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas zunächst transportlimitiert, wie **Abb. 33** und **34** zeigen. Bei der Einleitung von Proteinlösungen mit einer vorangehenden Luftblase zeigte Zumbrink [40] bei Fibrinogenlösungen, daß unterhalb von $c = 0,15 \mu\text{mol/l}$ die Adsorptionskinetiken wieder transportlimitiert sind. Bei Lösungen mit Phosphorylase *b*, konnten die Adsorptionskinetiken sogar bei Konzentrationen bis zu $c = 0,014 \mu\text{mol/l}$ an exponentielle Funktionen angepaßt werden. Bei Adsorptionsstudien von Avidin-FITC an immobilisiertem Biotin wurden Konzentrationen oberhalb von $c = 0,14 \mu\text{mol/l}$ verwendet und Kinetiken gefunden, die sogar an zweifach exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten. In der vorliegenden Arbeit konnten nur rhBMP-2-Konzentrationen oberhalb von $c = 0,385 \mu\text{mol/l}$ untersucht werden. Bei niedrigeren Konzentrationen erlaubt das ungünstige Signal-Rausch-Verhältnis keine eindeutige Anpassung.

Für die meisten Experimente wurde ein rotierender Konus am TIRF-Rheometer verwendet, der auf der gesamten Meßzellenoberfläche eine konstante Scherrate von $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$ erzeugt [156]. Die Angabe der Scherrate bezieht sich in der vorliegenden Arbeit lediglich auf die durch den rotierenden Konus erzeugte Scherung. Die Scherung, die durch die Strömung ($\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$) der eingeleiteten Lösungen verursacht wird, wurde nicht weiter berücksichtigt.

Bei der Einleitung einer Lösung von 5-Hydroxy-L-tryptophan ($c = 0,454 \text{ mmol/l}$) ohne Luftblase, lag nach $t_{1/2} = 6,12 \pm 0,14 \text{ s}$ die Hälfte der Endkonzentration vor, während die Einleitung mit einer Luftblase zu einer Verkürzung der Ankunfts halbwertszeit auf $t_{1/2} = 0,79 \pm 0,05 \text{ s}$ führte (**Tab. 6**, beide Experimente mit $\gamma = 720 \text{ s}^{-1}$). Ohne rotierenden Konus führte die Anwendung der Luftblase zu einer Verkürzung der Ankunfts halbwertszeiten von $t_{1/2} = 4,28 \pm 0,11 \text{ s}$ auf $t_{1/2} = 0,46 \pm 0,04 \text{ s}$ (**Tab. 5**). Unabhängig davon, ob eine Scherung vorliegt oder nicht, bewirkt die Anwendung einer Luftblase eine drastische Verkürzung der

Ankunftshalbwertszeiten um den Faktor 7,7 bis 9,3 (vergleiche **Tab. 5** und **6**). In [40] wurde für den gleichen Standard durch die Anwendung einer Luftblase eine Verkürzung der Ankunftshalbwertszeiten um den Faktor 8,7 gefunden. In [156] wird eine sehr starke Abhängigkeit der Durchmischungszeiten (Zeitdauer bis zum Erreichen der Endkonzentration) von der Scherrate beschrieben. Bei einer Scherrate von $\dot{\gamma} = 720 \text{ s}^{-1}$ (ohne Luftblase und ohne Durchströmung der Meßzelle) wurde in [156] eine Durchmischungszeit von $t = 60 \pm 5 \text{ s}$ angegeben, während in [40] $t = 30 \text{ s}$ bei der gleichen Scherrate (ohne Luftblase aber mit Durchströmung von $\dot{V} = 120 \text{ ml/h}$) angegeben ist und in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde, siehe **Abb. 26 A**.

Nach [42] wird die Transportlimitierung durch die Verwendung einer Luftblase bei Oberflächen mit einem Randwinkel von bis $\theta_{adv} = 90^\circ$ aufgehoben. Randwinkel oberhalb dieses Wertes wirken sich nachteilig auf die Interaktionen zwischen Makromolekülen und der Oberfläche aus [42]. Navier [238] beschrieb die Fluidgleitung an festen Grenzflächen als erster und führte den Gleitkoeffizienten β ein. Mit zunehmendem Gleitkoeffizienten erhöht sich die Gleitgeschwindigkeit. Bisher wurde der Luftblaseneffekt bei Adsorptionen nur an ultrahydrophilen Quarzglasoberflächen überprüft. Zur Überprüfung des Luftblaseneffektes wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere Oberflächen verwendet, die durch Modifizierung von Quarzglasoberflächen entsprechend **Kap. 3.3.4.1** bis **3.3.4.5** erhalten wurden. Beeindruckend ist aber, daß der Luftblaseneffekt bei der Adsorption von rhBMP-2 an kovalent gebundenem Trichlorhexylsilan (**Abb. 37** und **Tab. 3 C**) ebenfalls zu einer exponentiell verlaufenden Adsorption führt, obwohl hier mit einem Randwinkel von $\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$ eine stark hydrophobe Oberfläche vorliegt. Damit darf die mögliche Grenze der BLEB-Methode auf Oberflächen mit Randwinkeln von bis $\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$ erweitert werden. Ob das in [42] dargestellte Modell für hydrophobe Oberflächen ebenso Gültigkeit besitzt, bedarf einer weiteren Überprüfung. Bei hydrophilen Oberflächen wird die Bildung von kleinen Wirbeln durch das Vorhandensein von zwei durch Wirbel getrennte Flüssigkeitsschichten erklärt. Die unterhalb der Wirbel, also auf der Oberfläche befindliche Nanoschicht, fließt nur sehr langsam im Vergleich zur eingeleiteten Bulkphase. Dies wird durch die Adhäsion an der Oberfläche erklärt [195].

5.2 Bestimmung des Initialpunktes bei Adsorptionskinetiken

Bei Adsorptionskinetiken wird das Grundrauschen N_0 (siehe **Abb. 7**) abgezogen, so daß die Kinetik im Ursprung beginnt. Dieser Punkt ist der Initialpunkt. Bei der exponentiellen Anpassung einer Adsorptionskinetik ist die Bestimmung des Initialpunktes der kritische Punkt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um die Bestimmung des Initialpunktes zu standardisieren.

In der Literatur finden sich kaum (siehe weiter unten) Hinweise, die das Problem des Auffindens des Initialpunktes aufwerfen oder gar klären. In **Abb. 27** ist eine Kinetik für die Ankunft des nichtadsorbierenden Standards 5-Hydroxy-L-tryptophan dargestellt, aus welcher zweifelsfrei der Initialpunkt bestimmt werden kann. Bei der Betrachtung von Adsorptionskinetiken findet man einen Bereich von einer Sekunde, in welchem mehrere Meßpunkte zur Auswahl stehen, die als Initialpunkt für die exponentielle Anpassung infrage kommen können. Dieser Bereich stellt den Übergangsbereich (**Abb. 29**) vom Grundrauschen (Fluoreszenz bei Durchleitung der Pufferlösung) zum Fluoreszenzanstieg durch die Adsorption dar. Die Begrenzung des Übergangsbereiches ist in **Kap. 4.1.2** beschrieben. In **Tab. 7** sind für jeden Initialpunkt aus dem Übergangsbereich in **Abb. 29** die k_{obs} -Werte, welche im Bereich zwischen $k_{obs} = 0,1564 \pm 0,0064 \text{ s}^{-1}$ und $k_{obs} = 0,1872 \pm 0,0074 \text{ s}^{-1}$ liegen, aufgeführt. Mit jedem Initialpunkt aus dem Übergangsbereich konnten gute Anpassungen erzielt werden (siehe Residualwerte in **Tab. 7**). Als Initialpunkt wurde der Punkt ausgewählt, bei welchem die exponentielle Anpassung den höchsten Residualwert liefert. Bei der TIRF-Spektroskopie führt die Einleitung einer Luftblase zu keiner Fluoreszenzänderung, welche einen eindeutigen Hinweis auf den Initialpunkt liefern könnte. Bei der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) [15,239-241] mißt man für den Zeitraum des Luftblasendurchtritts durch die Meßzelle einen deutlichen Intensitätsanstieg [242]. Die Verwendung der Luftblase ist bei der SPR zurzeit nur in einer einzigen Arbeit beschrieben [242].

Die Beurteilung von exponentiellen Anpassungen alleinig durch den Korrelationskoeffizienten kann zu einer gravierenden Fehleinschätzung führen, wie **Abb. 33** (rote Kurve) zeigt. Dort liegen die Meßwerte in den ersten 10 s der Adsorptionskinetik unterhalb der Anpassungskurve, obwohl für die Anpassung ein guter Korrelationskoeffizient gefunden wurde. Aus diesem Grunde wurde ein Residual Runs Test bei den Messungen durchgeführt, dessen graphische Darstellung in **Abb. 33 B** durch eine rote Linie dargestellt ist. Hieraus folgt ein Residualwert von $P = 0,046$. Ergibt der Residual Runs Test einen Residualwert von mindestens $P = 0,050$, weicht die Anpassung nicht signifikant vom gewählten mathematischen Modell ab, daß heißt

die Anpassung ist mathematisch einwandfrei. In **Abb. 33** liegt z. B. eine sehr schlechte und in **Abb. 30** bis **32** eine sehr gute Anpassung vor. Die Berücksichtigung von Residualwerten zur Überprüfung der Signifikanz des gewählten Anpassungsmodells (exponentielle Anpassung) findet sich z. B. in [21,40,42,234]. In [243] wurde über eine mathematische Anpassung einer transportlimitierten Adsorptionskinetik berichtet. Dort wurde als Initialpunkt der erste Meßpunkt nach dem linearen Anteil der Adsorptionskinetik ausgewählt und der sich anschließende Kinetikverlauf an eine exponentielle Funktion angepaßt. Demnach wurde in [243] ein Startzeitpunkt (Initialpunkt) für die Anpassung ausgewählt, bei welchem die Adsorption schon weit vorangeschritten ist. Dadurch werden zu niedrige k_{obs} -Werte gefunden. In **Abb. 34** wurde als Initialpunkt der Wendepunkt bei einer transportlimitierten, sigmoidal verlaufenden Adsorptionskinetik ausgewählt. Die exponentielle Anpassung der Adsorptionskinetik ab dem Wendepunkt ergab die Geschwindigkeitskonstante $k_{obs*} = 0,1024 \pm 0,0051 \text{ s}^{-1}$. Eine exponentielle Anpassung einer reaktionslimitierten Adsorptionskinetik (**Abb. 31**) führte dagegen zur Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{obs} = 0,1782 \pm 0,0068 \text{ s}^{-1}$, welche fast doppelt so groß ist. Die in [243] angewandte Methode liefert falsche Geschwindigkeitskonstanten.

5.3 Photobleaching von rhBMP-2 bei Adsorptionen

Während man sich das Photobleaching [244] bei der FRAP-Technologie (Fluorescence Recovery After Photo Bleaching) zunutze macht, um die Diffusion von Proteinen oder Zellen sichtbar zu machen [114,115], indem in einem Areal die Proteine oder Zellen durch Laserlicht gebleicht werden, und das nun fluoreszenzärmere Areal beobachtet wird, wie durch die Diffusion unverbrannter Proteine oder Zellen von benachbarten Bereichen in das betrachtete Areal an Fluoreszenzintensität gewinnt, ist bei Untersuchungen am TIRF-Theometer das Photobleaching von Proteinmolekülen unerwünscht. Der Photobleach kann durch die Messung des Fluoreszenzverlustes beobachtet werden (**Abb. 41**).

Allgemein ist bekannt, daß 5-Hydroxy-L-tryptophan durch UV-Licht photochemisch zerstört wird [245]. Dies gilt auch für Proteinmoleküle, die Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin enthalten [246,247]. Das Photobleaching wird hauptsächlich durch Reaktionen mit Singulett-sauerstoff im Zusammenhang mit UV-Licht hervorgerufen [122,248-250]. Das Protein rhBMP-2 besitzt vier Tryptophaneinheiten [108] und wird durch UV-Licht ebenfalls photochemisch zerstört, wie **Abb. 41** zeigt. Der gezeigte Fluoreszenzverlauf konnte an eine zweifache exponentielle Funktion angepaßt werden und lieferte die Photobleachgeschwindigkeitskonstanten $k_{-1}^p = 2,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-2}^p = 3,9 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (**Abb. 41**). Nachdem die rhBMP-2-

Moleküle 124 h an der Oberfläche gebunden waren (hierbei handelt es sich um die nach dem Desorptionsexperiment in **Abb. 48** noch auf der Quarzglasoberfläche adsorbierten Proteinmoleküle), führte die Dauerbestrahlung mit UV-Licht zu den Photobleachgeschwindigkeitskonstanten $k_{-1}^p = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-2}^p = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, die um den Faktor drei kleiner sind (**Abb. 49**). Der lange Aufenthalt (124 h) muß zu einer Veränderung der Proteinmoleküle auf der Oberfläche geführt haben, die die Diffusion des Singulett-Sauerstoffs zu den Tryptophanmolekülen (Trp 28 und 31 [251]) im Protein einschränkt. Häufig wurden mehrfach exponentielle Fluoreszenzzerfälle von Proteinen in der Literatur beschrieben [252]. In wenigen Fällen wurden einfach exponentielle Zerfälle gefunden [253,254]. Das Photobleaching von rhBMP-2-Molekülen wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Da die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas oder PDLLA mit bis zu 100 s sehr schnell abläuft (vergleiche Adsorptionshalbwertszeiten in **Tab. 16** und **19**), war es erforderlich, die Adsorptionsexperimente unter dauerhafter Bestrahlung mit UV-Licht durchzuführen, um viele Meßwerte zu erhalten. Bei einer Belichtungsdauer von 100 s wurde im Adsorptionsgleichgewicht eine Fluoreszenz gemessen, die um 12 % niedriger ist als die Fluoreszenz nach Korrektur mit den Bleachfaktoren (**Abb. 43**). Bei einer Belichtungsdauer von 10 s findet kein Photobleaching statt, so daß sich die gemessene und der korrigierte Fluoreszenz überlagern (**Abb. 44**). Bei sehr schnell verlaufenden Adsorptionen wird das Adsorptionsgleichgewicht erreicht, bevor eine meßbare photochemische Zerstörung der adsorbierten Proteinmoleküle eintreten kann. Das Photobleaching kann bei der Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas oder an PDLLA vernachlässigt werden (siehe Konstanten in **Tab. 17** und **20**). Für die Bindung von rhBMP-2 an PDLLA wurde vereinfachend angenommen, daß die photochemische Zersetzung unter diesen Bedingungen genauso abläuft, wie bei der Bindung an Quarzglas.

5.4 Fluoreszenzquenching von rhBMP-2 bei Adsorptionen

Die gemessene Fluoreszenz wird durch Photobleaching (photochemische Zerstörung) und Fluoreszenzquenching (Fluoreszenzauslöschung) verfälscht [45]. Da bei schnellen Adsorptionen das Photobleaching keine Rolle spielt (siehe Bleachkonstanten in **Abb. 42**), kann durch einen Vergleich mit einer Kontrollmessung mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 der Einfluß des Fluoreszenzquenching nachgewiesen werden (siehe **Kap. 4.3.3**). Bei Desorptionen sind die adsorbierten Proteinmoleküle lange Zeit der UV-Strahlung ausgesetzt, so daß eine Differenzierung zwischen Desorption und Einfluß des UV-Lichtes kaum möglich ist. Das Photobleaching trägt nicht zu einer Verfälschung der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten bei, siehe **Tab. 17** und **20**. Das Fluoreszenzquenching ist meistens dafür verantwortlich, daß sich

die Quantenausbeute verringert und deswegen eine zu niedrige Fluoreszenz gemessen wird, da die Moleküle ihre absorbierte Energie an benachbarte Molekülbestandteile, Moleküle oder das Lösungsmittel abgeben, siehe **Kap. 2.3.4**. Mit einem Anstieg der Molekülkonzentration auf der Oberfläche steigt die Wahrscheinlichkeit, daß angeregte Moleküle ihre Energie strahlungslos an ihre Umgebung abgeben können, was zu einer Verringerung der gemessenen Fluoreszenz führt. Daraus folgt, daß sich mit zunehmender Oberflächenkonzentration die Quantenausbeute verringert. Dies trifft z. B. bei der Adsorption von Phosphorylase *b* und Fibrinogen auf Quarzglas zu [40,146]. Dieses Phänomen wird in der Literatur als Selfquenching [134] beschrieben. Für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas konnte eine Umkehrung dieses Phänomens beobachtet werden, wie **Abb. 45** zeigt. In [255,256] wurde beschrieben, daß hohe Drücke zu einer Einschränkung der Rotation von Fluorophoren in Molekülen oder zur Ausbildung von gestaffelten Anordnungen von Fluorophoren führen können, die ein Selfquenching verursachen. Zwar kamen in den durchgeführten Experimenten keine hohen Drücke zur Anwendung, doch führt vermutlich die sehr hohe Affinität des rhBMP-2 zu Quarzglas dazu, daß die Tryptophanmoleküle Trp 28 und 31 [251] in eine gestaffelte Anordnung gezwungen werden. Dadurch liegen die π -Systeme der Tryptophanmoleküle übereinander, wodurch die aufgenommene Energie eines Tryptophanmoleküls über das π -System an das andere abgeben werden kann und es zu einer starken Fluoreszenzauslöschung kommt [257]. Bei hohen Konzentrationen binden zwar mehr Proteinmoleküle auf der Oberfläche (siehe Adsorptionsisothermen in **Abb. 59** und **63**), doch kommt es infolge sterischer Hinderung zu einer schwächeren Bindung der Proteinmoleküle an der Oberfläche. Dadurch kann die Ausbildung gestaffelter Anordnungen von Tryptophanresten eingeschränkt oder sogar verhindert werden. Bei verdünnten Proteinlösungen erfolgt die Ausbildung hochaffiner Spezies, da sich die Moleküle auf der Oberfläche kaum behindern und deswegen die Anzahl der Bindungen erhöhen können (siehe **Abb. 67**).

Bei der Korrektur der gemessenen Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45**, darf keine zusätzliche Korrektur mit den Bleachkonstanten erfolgen, da diese bereits in den Quenchfaktoren enthalten sind. Beim Photobleaching beinhaltet die gemessene Fluoreszenz das Fluoreszenzquenching. Da die Korrektur mit den Quenchfaktoren nur bei Adsorptionskinetiken für die Bindung von rhBMP-2 an Quarzglas vorgenommen wurde, beschränken sich die Betrachtungen in diesem Kapitel nur auf ebendieses System.

Ohne Korrektur mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** konnten alle Adsorptionskinetiken nur an einfach exponentielle Funktionen angepaßt werden, siehe z.B. **Abb. 56** (Kinetik *A*). Die Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren führte zu Kinetiken, die aus-

schließlich an zweifach exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten, siehe Kinetik **B** in **Abb. 56**. Aus den Adsorptionskinetiken resultieren nach der zweifachen exponentiellen Anpassung zwei konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten, nämlich $k_{obs,A}$ und $k_{obs,B}$. Erstere wurde dem schneller adsorbierenden (A) und letztere dem langsamer adsorbierenden (B) Nukleations-Komplex (Spezies I) zugewiesen. Beim Nukleations-Komplex ist das Protein mit einem Minimum an Bindungsstellen an der Substratoberfläche gebunden [32]. Die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante des langsamer adsorbierenden Nukleations-Komplexes IB (Steigung der Auftragung $k_{obs,B}$ vs. c , siehe **Abb. 58** mit Berücksichtigung der Quenchfaktoren) ist ähnlich groß wie die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante des Nukleations-Komplexes I aus der Auftragung k_{obs} vs. c ohne Berücksichtigung der Quenchfaktoren, siehe **Tab. 17**. Die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante der Konformation IA ist um den Faktor 2,7 größer als diejenige der Spezies IB (siehe **Tab. 17**).

5.5 Einfluß des UV-Lichtes bei Desorptionen

Bis hier wurde der Begriff Konformation weitestgehend vermieden; an seiner Statt wurde der Begriff Spezies verwendet. Ein Molekül kann entweder seitlich (side-on) oder mit seinen Enden (end-on) an der Oberfläche binden. Mit Zunahme der Bindungen erhöht sich die Affinität des Proteins. Hierdurch wird die Struktur des Proteins verändert; es entsteht eine neue Konformation. Mit der Zunahme der Affinität geht die Reduktion der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten einher. Die Größe der Geschwindigkeitskonstanten kann durch Photobleaching oder Fluoreszenzquenching verfälscht werden, weshalb die Konstanten mit den Indizes α , β oder γ gekennzeichnet wurden (siehe **Kap. 4.3.5**). In diesem Abschnitt sollen Zusammenhänge zwischen den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten und den entsprechenden Versuchsbedingungen hergeleitet werden, die es ermöglichen sollen, Konstanten zu extrapolieren, die nicht experimentell ermittelt wurden.

Bei einer Belichtungsrate von 124 s/h wurden die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^{\gamma} = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ für die Desorption von rhBMP-2 von Quarzglas gefunden, siehe Kinetik **B** in **Abb. 48**. Unter sonst gleichen Bedingungen lieferte ein weiteres Experiment bei einer Belichtungsrate von 21 s/h (Kinetik **A** in **Abb. 48**) die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (beide Experimente wurden nach einer Vorinkubation über 500 s durchgeführt). Zwei Geschwindigkeitskonstanten in einer Kinetik weisen auf das Vorhandensein von zwei rhBMP-2-Spezies auf der Oberfläche hin. Die Reduktion der Belichtungsrate von 124 s/h (Kinetik **B** in **Abb. 48**) auf 21 s/h (Kinetik **A** in **Abb.**

48) führt zu einer Verringerung Geschwindigkeitskonstanten um den Faktor 0,235 im stärker abfallenden Kinetikanteil und um den Faktor 0,232 im langsamer anfallenden Kinetikanteil. Obwohl die Gesamtbelichtungszeiten in beiden Experimenten (43 Minuten in Kinetik **A** und 38 Minuten in Kinetik **B**, beide in **Abb. 48**) sehr ähnlich sind, führt die Ausdehnung der Dunkelphasen offensichtlich zu einer Regeneration der gebundenen Proteinmoleküle, so daß die photochemische Zerstörung hinausgezögert und deshalb eine höhere Fluoreszenz gemessen wird. Über die Regeneration der Fluoreszenz siehe [258-261].

Da in beiden Experimenten, abgesehen von den Belichtungsraten, die gleichen Bedingungen vorliegen, wurde angenommen, daß auf der Oberfläche die gleichen Spezies vorliegen, nämlich eine niederaffine Konformation II und eine hochaffine Konformation III. Somit muß das Fluoreszenzquenching in beiden Experimenten gleich sein. Die Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten um die o. a. Faktoren wurde deshalb auf das Photobleaching zurückgeführt. Aus diesem Grunde wurden die Konstanten 0,235 und 0,232, in Analogie zu f_B in Gl. 97, als Photobleachkonstanten f_B^* bezeichnet. Daß in beiden Kinetiken in **Abb. 48** die gleichen Spanwerte gefunden wurden unterstützt überdies die Annahme, daß unter diesen Bedingungen die gleichen Konformationen auf der Oberfläche vorliegen. Im Falle von Konformationsänderungen, die durch UV-Licht hervorgerufen würden, wiesen die entstandenen Konformationen ein verändertes Quenchverhalten auf. Das wiederum hätte zur Folge, daß andere Spanverhältnisse und Geschwindigkeitskonstanten gefunden würden. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^\beta = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-2}^\gamma = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ bzw. $k_{-3}^\beta = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^\gamma = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ sind beide gleich stark durch das Fluoreszenzquenching verfälscht. Kontrollexperimente mit radioaktiv markiertem rhBMP-2 auf rechtwinkligen Quarzglasplatten in zylindrischen Durchflußzellen nach **Kap. 3.3.11** konnten nicht durchgeführt werden, da in diesen Zellen die Beladung der Oberflächen mit rhBMP-2 nach der BLEB-Methode [42], also ohne Transportlimitierung, nicht durchführbar ist.

Aus diesem Grunde wurde ein Kontrollexperiment nach einer Gleichgewichtseinstellung über 19 h durchgeführt (Kinetik **B** in **Abb. 50**), welchem ein TIRF-Experiment (ebenfalls nach einer Gleichgewichtseinstellung über 19 h, Kinetik **A** in **Abb. 50**) gegenüberstellt wurde. Es wurde angenommen, daß in beiden Experimenten nach 19 h auf der Oberfläche die gleichen Konformationen vorliegen, unabhängig davon, ob die Beladung der Oberfläche mit rhBMP-2 in der TIRF-Zelle nach der BLEB-Methode [42] oder nach der Methode in **Kap. 3.3.11** (Lagerung der Quarzglasplatte in Proteinlösung) erfolgte. Aus dem Kontrollexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) wurde für die langsam desorbierende Konformation III die Desorptionsgeschwindigkeitskon-

stante $k_{-3} = k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (siehe **Kap. 4.5.1.3**) erhalten, die um den Faktor 0,933 kleiner ist als die Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ aus dem TIRF-Experiment (Kinetik **A** in **Abb. 50**). In Abgrenzung zur Konformation III mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ aus dem Experiment **A** in **Abb. 48** sollen die Konformationen mit den Geschwindigkeitskonstanten $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3} = k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (beide in **Abb. 50**) als Konformation IV bezeichnet werden (siehe **Kap. 4.5.1.3**). Im Experiment **A** in **Abb. 50** ist mit 68 h der Beobachtungszeitraum zwar deutlich kürzer als im Kontrollexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) mit 391 h, doch soll für die weiteren Betrachtungen angenommen werden, daß auch bei Ausweitung des Beobachtungszeitraumes über 68 h hinaus, die Geschwindigkeitskonstanten unverändert bleiben. Da die photochemische Zerstörung exponentiell verläuft (**Abb. 41** und **49**), scheint im Falle der langsam desorbierenden Konformation IV in Kinetik **A** (**Abb. 50**) der annähernd lineare Verlauf zunächst widersprüchlich. Die Linearität kann nur damit erklärt werden, daß die UV-Bestrahlung der Konformation IV mit einer Belichtungsrate von 21 s/h kein signifikantes Photobleaching verursacht. Aus diesem Grunde soll das Fluoreszenzquenching für das Experiment am TIRF-Rheometer (Kinetik **A** in **Abb. 50**) genauer untersucht werden.

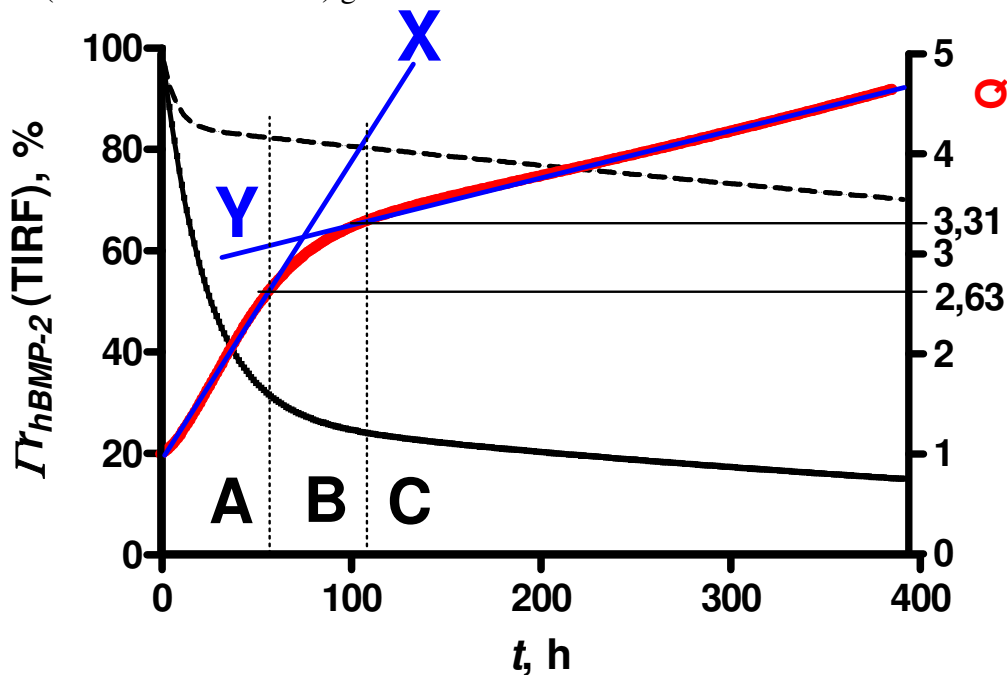


Abb. 65. *Abhängigkeit der Beladungen und Quenchfaktoren von der Zeit für die apparente Desorption von rhBMP-2 von Quarzglas mit PBS-Puffer (pH = 7,4). Schwarze, durchgezogene Kurve: Anpassungskurve Kinetik A aus Abb. 50 (TIRF). Linke Ordinate: Oberflächenkonzentration in Prozent. Rote Kurve: Änderung der Quenchfaktoren (Q) während der apparenten Desorption. Rechte Ordinate: Quenchfaktoren. Schwarze, gestrichelte Kurve: Kontroll-experiment aus Abb. 50 (Kinetik B). Bereich A: Änderung von Q fast linear (Gerade X mit Steigung $0,0298 \pm 0,0002$ ($r^2 = 0,997$)). Bereich B: Änderung von Q nicht linear. Bereich C: Änderung von Q fast linear (Gerade mit Steigung $Y = 0,0045 \pm 0,0000$ ($r^2 = 0,999$)). $\bar{x} \pm S.D.$*

Die Abbildung **Abb. 65** zeigt die Anpassungskurve des Experimentes (Kinetik **A** in **Abb. 50**) bei einer Belichtungsrate von 21 s/h am TIRF-Rheometer als schwarze, durchgezogene Kurve und die Änderung der Quenchfaktoren als rote Kurve. Die Quenchfaktoren nehmen von Bereich **A** in Richtung Bereich **C** zwar zu, doch flacht der Anstieg ab. Die Anpassungskurve des Kontrollexperimentes (Kinetik **B** in **Abb. 50**) ist als gestrichelte Kurve eingezeichnet. Die Berechnung der Quenchfaktoren für die hochaffinen rhBMP-2-Spezies erfolgte entsprechend **Kap. 4.3.3** über die Division der Beladungen aus der Radioiodmethode (Kinetik **B** in **Abb. 50**) durch die Beladungen, welche aus der Fluoreszenz berechnet wurden (TIRF, Kinetik **A** in **Abb. 50**). Über weite Teile verläuft der langsame Kinetikanteil im Bereich **C** fast linear (schwarze Kurve in **Abb. 65**). Die Änderung der Quenchfaktoren (rote Kurve in **Abb. 65**) verläuft im Bereich **C** ebenfalls fast linear, siehe Gerade **Y** in **Abb. 65**.

Für die niederaffine Konformation II findet man im TIRF-Experiment bei einer Belichtungsrate von 21 s/h (Kinetik **A** in **Abb. 50**) eine Geschwindigkeitskonstante $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und beim Kontrollexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) eine Desorptionsgeschwindigkeitskonstante von $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Überraschend ist, daß die Geschwindigkeitskonstante beim Kontrollexperiment sogar um den Faktor 3,475 größer ist. Die gemessene Fluoreszenz (schwarze, durchgezogene Kurve in **Abb. 65**) der schneller desorbierenden Konformation II (Bereich **A** in **Abb. 65**) verläuft exponentiell und wird wahrscheinlich zusätzlich durch Photobleaching verfälscht. Demgegenüber verläuft die Änderung der Quenchfaktoren näherungsweise linear (in **Abb. 65** Linie **X** im Bereich **A**). Beide Phänomene führen offensichtlich dazu, daß die Geschwindigkeitskonstante $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ im TIRF-Experiment (Kinetik **A** in **Abb. 50**) kleiner wird.

Die Betrachtung der Spanwerte zeigt, daß die langsam abfallende Phase (Konformation IV) im Kontrollexperiment von 85 % (Kinetik **B** in **Abb. 50**) auf 26 % im TIRF-Experiment (Kinetik **A** in **Abb. 50**) absinkt. Das scheint zunächst auf eine Änderung der auf der Oberfläche gebundenen Konformationen hinzuweisen. Bei den Experimenten in **Abb. 48** wurde dagegen keine Veränderung der Spanverhältnisse, trotz Reduktion der Belichtungsraten von 124 s/h auf 21 s/h, gefunden, woraus geschlossen wurde, daß keine Konformationsänderungen stattgefunden haben können. Deshalb soll angenommen werden, daß dieser Schluß auch gilt, wenn die Belichtungsraten weiter von 21 s/h (Kinetik **A** in **Abb. 50**) auf 0 (Kontrollexperiment **B** in **Abb. 50**) reduziert werden. Als Grund für den Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten im schnell abfallenden Kinetikteil in **Abb. 50** um den Faktor $f_0^{21} = 3,475$ wurde Fluoreszenzquenching vermutet und keine Konformationsumwandlung. Bei der Konformation IV in

Abb. 50 beträgt der Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten $f_I = 0,933$. Infolge der sehr hohen Affinität der Konformation IV wird angenommen, daß das Photobleaching, im Gegensatz zur Spezies II, deutlich eingeschränkt ist (siehe **Kap. 5.3**). Die Annahme wird auch durch den Vergleich der Photobleachexperimente nach unterschiedlichen Aufenthaltsdauern der Proteinmoleküle auf der Oberfläche (3000 s in **Abb. 41** und 124 h in **Abb. 49**) gestützt, bei welcher eine längere Aufenthaltsdauer das Photobleaching reduziert. Eine weitere Reduktion der Belichtungsrate auf unterhalb von 21 s würde Klärung bringen, doch war dies technisch nicht möglich.

In **Abb. 65** weicht im Bereich **B** das Fluoreszenzquenching stark von der Linearität ab, er ist durch gepunktete Vertikalen begrenzt. Aus diesem Bereich wurden die Quenchfaktoren, die zwischen 2,63 und 3,31 liegen, verwendet, um die Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ aus der Kinetik **A** in **Abb. 48** bzw. Kinetik **B** in **Abb. 60** zu korrigieren. Die erhaltene Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^* = 5,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ gilt für eine Desorption ohne UV-Belichtung, welche nach einer Vorinkubation über 500 s gefunden würde. Ein Radioiod-experiment, das diese Konstante bestätigen sollte, konnte aber unter diesen Bedingungen nicht durchgeführt werden (siehe **Kap. 3.3.11**). Zur Korrektur des schnell absinkenden Kinetikanteils in Kinetik **A** in **Abb. 48** bzw. Kinetik **B** in **Abb. 60** aus dem die Geschwindigkeitskonstante $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ für die Konformation II entnommen wurde, können bedenkenlos die Quenchfaktoren aus dem linearen Anteil im Bereich **A** aus **Abb. 65** verwendet werden, da die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Konformation II aus Kinetik **B** in **Abb. 60** und aus Kinetik **C** in **Abb. 60** bzw. schwarze Kurve in **Abb. 65** fast gleich sind.

Die Korrektur der Kinetiken mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** ist unzulässig, da sie nur für die niederaffinen Nukleations-Komplexe (Konformation I) gelten. Überdies würde man fälschlicherweise zu niedrige Quenchfaktoren aus **Abb. 45** anwenden, was enorme Fehler verursacht. Zur Übersicht sind die oben beschriebenen Zusammenhänge der Geschwindigkeitskonstanten mit den einzelnen Umrechnungsfaktoren f_B^* , f_I und f_0^{2I} im nachfolgenden Schema dargestellt.

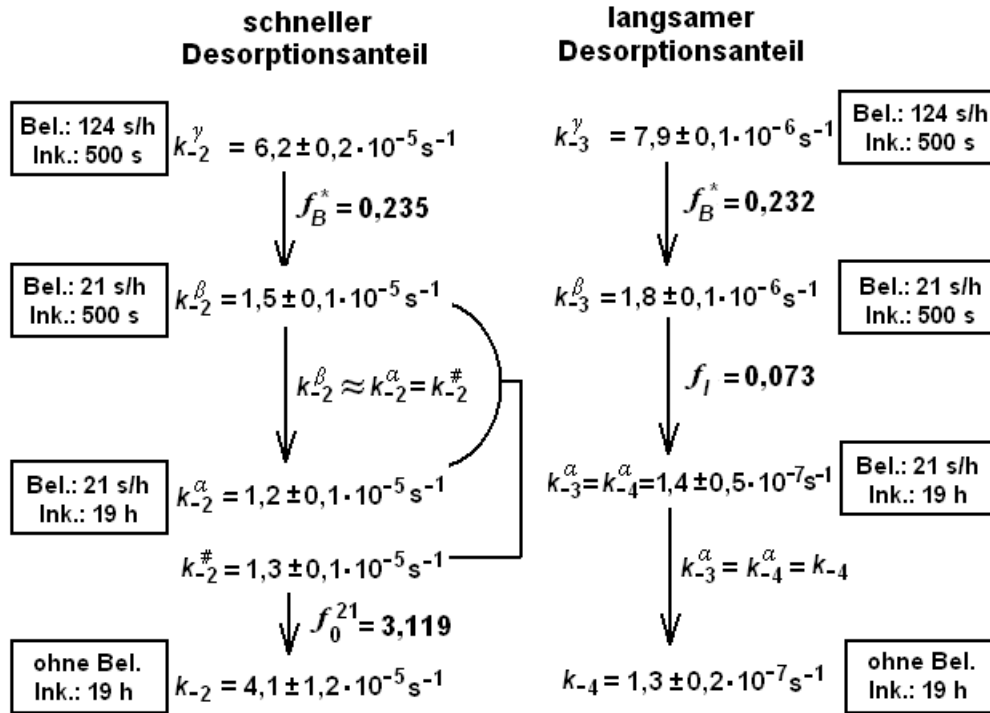


Abb. 66. Zusammenhang der experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten mit den Umrechnungsfaktoren. f_B^* : Umwandlung durch Photobleaching. f_I : Umwandlung durch Verlängerung der Gleichgewichtseinstellung (Vorinkubation) von 500 s auf 19 h. f_0^{21} : Umwandlung durch Photobleaching und Fluoreszenzquenching. Bel.: Belichtungsrate. Ink.: Dauer der Gleichgewichtseinstellung (Vorinkubation). Symbole: γ : Belichtungsrate 124 s/h (Desorption nach 500 s Vorinkubation). β : Belichtungsrate 21 s/h (Desorption nach 500 s Vorinkubation). α : Belichtungsrate 21 s/h (Desorption nach 19 h Vorinkubation). $\#$ Mittelwert aus k_{-2}^{α} und k_{-2}^{β} . Weitere Erklärungen, siehe Text hiernach.

Das Schema in **Abb. 66** zeigt, wie die Geschwindigkeitskonstanten miteinander verknüpft sind. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ beinhalten weder Photobleaching noch Fluoreszenzquenching, da sie über die Radioiodmethode bestimmt wurden. Hier handelt es sich tatsächlich um reine Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten. Die Geschwindigkeitskonstante $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ wurde mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 65** (Bereich **B**) korrigiert, so daß die Konstante $k_{-3}^* = 5,3 \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ resultiert. Da trotz Korrektur von k_{-3}^{β} weder Photobleaching noch Fluoreszenzquenching sicher auszuschließen sind, wurde die Geschwindigkeitskonstante mit einem Sternchen indiziert.

Im folgenden sollen die Zusammenhänge des Schema in **Abb. 66** kurz erläutert werden. Die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 6,2 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^{\gamma} = 7,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ wurden experimentell (siehe Kinetik **B** in **Abb. 48**) bei einer Belichtungsrate von 124 s/h bei der Elution mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$) ermittelt. Vor dem Experiment erfolgte eine Vorinkubation

über 500 s. Unter sonst gleichen Bedingungen wurden bei einer Belichtungsrate von 21 s/h die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ bestimmt (siehe Kinetik **A** in **Abb. 48**). Die Konstanten k_{-2}^{γ} und k_{-2}^{β} der niederaffinen bzw. k_{-3}^{γ} und k_{-3}^{β} der hochaffinen Spezies sind über die Faktoren $f_B^* = 0,235$ bzw. $f_B^* = 0,232$ miteinander verbunden (siehe **Kap. 4.3.5**). Die Konstante $k_{-2}^{\beta} = 1,5 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A** in **Abb. 48**, nach Vorinkubation über 500 s) ist etwa so groß wie die Konstante $k_{-2}^{\alpha} = 1,2 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A** in **Abb. 50**, nach Vorinkubation über 19 h) und wurden beide bei einer Belichtungsrate von 21 s/h bestimmt. Deswegen wurde angenommen, daß es sich hier um die gleichen Spezies handelt, weshalb beide Konstanten zu $k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ gemittelt wurden. Ohne Belichtung wurde $k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ für die Konformation II aus dem Radioiodexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) gefunden. Die Geschwindigkeitskonstante ist um den Faktor $f_0^{21} = 3,119$ größer als $k_{-2}^{\#}$. Während sich $k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (vergleiche Kinetik **A** in **Abb. 48** mit Kinetik **A** in **Abb. 50**) durch Vergrößerung der Inkubationsdauer von 500 s auf 19 h fast nicht ändert, verringert sich die Geschwindigkeitskonstante von $k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A** in **Abb. 48** bzw. Kinetik **B** in **Abb. 60**) auf $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ (Kinetik **A** in **Abb. 60**) um den Faktor $f_I = 0,073$. Da die Belichtungszeiten jeweils 21 s/h betrugen, wurde die Änderung der Konstanten der Ausdehnung der Inkubationszeiten von 500 s auf 19 h zugeschrieben (**Abb. 60**). Beim Radiojodexperiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) wurde für die hochaffine Spezies mit $k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ die gleiche Geschwindigkeitskonstante ermittelt wie beim TIRF-Experiment (Kinetik **B** in **Abb. 50**) mit $k_{-3}^{\alpha} = k_{-4}^{\alpha} = 1,4 \pm 0,5 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Beachte Legende unter **Abb. 50**, Text auf S. 108 und **Kap. 4.5.1.3**.

Die Bindungskonstanten ergeben sich aus der Division der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten durch die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten. Die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgte mit den Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Nukleations-Komplexe $k_{+1A} = 1,87 \pm 0,08 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Abb. 57**) und $k_{+1B} = 6,91 \pm 0,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Abb. 58**). Die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten der höheraffinen Konformationen waren experimentell nicht zugänglich. Die Desorptionsgeschwindigkeiten, abgesehen von denjenigen des Kontrollexperimentes (Kinetik **B** in **Abb. 50**), beinhalten den Einfluß von Photobleaching und Fluoreszenzquenching. Mit jeder Desorptionsgeschwindigkeitskonstante können zwei Bindungskonstanten, die mit **A** bzw. **B** indiziert wurden, je nachdem, ob k_{+1A} oder k_{+1B} zu ihrer Berechnung herangezogen wurde, berechnet werden. Die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten, außer k_{-1A} und k_{-1B} , wurden aus den Desorptionsexperimenten (siehe **Abb. 48, 50, 60**

und **6I**) erhalten. Die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der höheraffinen Konformationen werden beeinflusst durch das UV-Licht (**Abb. 48**), durch die Dauer der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes (Inkubationsdauer, **Abb. 60**) und durch die Art des Elutionspuffers (**Abb. 6I**). Für die Berechnung der Bindungskonstanten wurden neben den Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1A} und k_{-1A} (**Abb. 57**) und k_{+1B} und k_{-1B} (**Abb. 58**) nur die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\#}$, k_{-3}^{β} , k_{-2} und k_{-4} verwendet. In **Tab. 21** sind die Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an nativem Quarzglas aufgeführt. Sie gelten für eine Temperatur von 23 °C.

Tab. 21. Gegenüberstellung der kinetischen Konstanten für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas bei $pH = 4,5$ und für die Elution mit PBS-Puffer bei $pH = 7,4$. *

Konformation	GG-Einstellung (Puffer)	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante [$M^{-1}s^{-1}$]	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante [s^{-1}]	Bindungskonstante [M^{-1}]
IA	bis 100 s (NaAc) $pH = 4,5$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-1A} = 4,1 \pm 6,3 \cdot 10^{-2}$	$K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6$
IB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-1B} = 2,2 \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$	$K_{IB}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6$
IIA [#]	500 s oder 19h (PBS) $pH = 7,4$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5}$	$K_{IIA}^{\#}' = 1,4 \pm 0,1 \cdot 10^{10}$
IIB [#]		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-2}^{\#} = 1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-5}$	$K_{IIB}^{\#}' = 5,2 \pm 0,5 \cdot 10^9$
IIIA	500 s (PBS) $pH = 7,4$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \bullet$	$K_{IIIA}^{\beta}' = 1,0 \pm 0,1 \cdot 10^{11} \bullet$
IIIB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-3}^{\beta} = 1,8 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \bullet$	$K_{IIIB}^{\beta}' = 3,8 \pm 0,4 \cdot 10^{10} \bullet$
IIA	19 h (PBS) $pH = 7,4$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$K_{IIA}' = 4,6 \pm 1,6 \cdot 10^9$
IIB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-2} = 4,1 \pm 1,2 \cdot 10^{-5}$	$K_{IIB}' = 1,7 \pm 0,6 \cdot 10^9$
IVA		$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$	$K_{IVA}' = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12}$
IVB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-4} = 1,3 \pm 0,2 \cdot 10^{-7}$	$K_{IVB}' = 5,2 \pm 0,8 \cdot 10^{11}$

* Vor den Desorptionsexperimenten erfolgte eine Inkubation über 500 s bzw. 19 h in rhBMP-2-Lösung ($c = 3,85 \mu\text{mol/l}$). Bei den Adsorptionsexperimenten erfolgte die Gleichgewichtseinstellung während der Adsorption. Die Elution erfolgte mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$). In der ersten Spalte stehen die Bezeichnungen der rhBMP-2-Konformationen. \bullet Ohne Berücksichtigung der Quenchfaktoren. Mit Berücksichtigung der Quenchfaktoren aus **Abb. 65** (Bereich **B**) ergeben sich die Bindungskonstanten $K_{IIIA}^* = 3,6 \pm 0,5 \cdot 10^{10} M^{-1}$ und $K_{IIIB}^* = 1,3 \pm 0,4 \cdot 10^{10} M^{-1}$. [#] Konstanten aus Mittelwert der Experimente in **Abb. 60**. Fehler für die Sorptionskonstanten: $\bar{x} \pm S.E.$. Fehler für die Bindungskonstanten: $y \pm \Delta y$.

Die Konformationen IA und IB (Nukleations-Komplexe) besitzen die niedrigsten Affinitäten, die zwar ähnlich sind, doch sind die ihnen zugrundeliegenden Geschwindigkeitskonstanten sehr verschieden, siehe **Tab. 17** und **21**. Es handelt sich offensichtlich um zwei unterschiedliche Konformationen (IA und IB). Bereits 500 s nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes erhöht sich die Affinität des gebundenen Proteins um wenigstens drei Zehnerpotenzen, wie der Vergleich der Bindungskonstanten der Konformationen IA und IB mit den Bindungskonstanten der höheraffinen Konformationen in **Tab. 21** zeigt. Möglicherweise findet die Ausbildung höheraffiner Konformationen schon während der Adsorption nach wenigen Sekunden statt. Die Bindungskonstanten der Konformationen IIA[#], IIB[#], IIIA und IIIB könnten noch den Einfluß des Photobleachings und des Fluoreszenzquenchings enthalten. Eine genauere Besprechung der Bindungskonstanten findet im **Kap. 5.8.1** statt.

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten höheraffiner rhBMP-2-Konformationen wurde in den vorangegangenen Kapiteln die Freisetzung des Proteins mit PBS-Puffer behandelt. Die Elution des gebundenen Proteins mit NaAc-Puffer ($pH = 4,5$) wurde im Vergleich dazu nur an einem Experiment untersucht, das in **Abb. 61** (Kinetik **B**) dargestellt ist. Die Elution erfolgte bei einer Belichtungsrate von 124 s/h. Vor dem Experiment erfolgte eine Inkubation über jeweils 500 s in rhBMP-2-Lösung und danach in PBS-Puffer. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit den Umrechnungsfaktoren f_B^* , f_I und f_0^{2I} nach dem Schema in **Abb. 66** extrapoliert. Hierfür wurde das Fluoreszenzverhalten (Photobleaching und Fluoreszenzquenching) angenommen, wie bei der Elution mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$). Als Basis zur Extrapolation dienten die experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^\gamma = 4,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-3}^\gamma = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ aus dem Experiment in **Abb. 61**. Die extrapolierten Konstanten wurden mit e indiziert und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 22. Gegenüberstellung der kinetischen Konstanten für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas bei $pH = 4,5$ und für die Elution mit NaAc-Puffer bei $pH = 4,5$.*

Konformation	GG-Einstellung (Puffer)	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante [$M^{-1}s^{-1}$]	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante [s^{-1}]	Bindungskonstante [M^{-1}]
IA	bis 100 s (NaAc) $pH = 4,5$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	$k_{-1A} = 4,1 \pm 6,3 \cdot 10^{-2}$	$K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6$
IB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-1B} = 2,2 \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$	$K_{IB}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6$
IIIA	500 s oder 19h (PBS) $pH = 4,5$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	${}^e k_{-3}^\beta = 4,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \bullet$	${}^e K_{IIIA}^{\beta'} = 4,7 \pm 0,1 \cdot 10^{10} \bullet$
IIIB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-3}^\beta = 4,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \bullet$	${}^e K_{IIIB}^{\beta'} = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{10} \bullet$
IIA	19 h (NaAc) $pH = 4,5$	$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	${}^e k_{-2} = 3,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	${}^e K_{IIA}' = 5,6 \pm 0,5 \cdot 10^9$
IIB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-2} = 3,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	${}^e K_{IIB}' = 2,1 \pm 0,2 \cdot 10^8$
IVA		$k_{+1A} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	${}^e k_{-4} = 2,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-7}$	${}^e K_{IVA}' = 6,4 \pm 0,4 \cdot 10^{11}$
IVB		$k_{+1B} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-4} = 2,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-7}$	${}^e K_{IVB}' = 2,4 \pm 0,1 \cdot 10^{11}$

* Bei den Adsorptionsexperimenten erfolgte die Gleichgewichtseinstellung während der Adsorption. Die Elution erfolgte mit NaAc-Puffer ($pH = 4,5$). In der ersten Spalte stehen die Bezeichnungen der rhBMP-2-Konformationen. Index e : nach dem Schema in **Abb. 66** extrapolierte Konstanten. \bullet Ohne Berücksichtigung der Quenchfaktoren. Mit Berücksichtigung der Quenchfaktoren aus **Abb. 65** (Bereich **B**) ergeben sich die Bindungskonstanten ${}^e K_{IIIA}^* = 1,6 \pm 0,2 \cdot 10^{10} M^{-1}$ und ${}^e K_{IIIB}^* = 5,8 \pm 0,8 \cdot 10^9 M^{-1}$. Fehler für die Sorptionskonstanten: $\bar{x} \pm S.E.$ Fehler für die Bindungskonstanten: $y \pm \Delta y$.

Die Elution mit NaAc-Puffer ($pH = 4,5$) führt zu einer Vergrößerung der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten um etwa eine Zehnerpotenz. Eine genauere Besprechung der Bindungskonstanten findet im **Kap. 5.8.1** statt.

In **Tab. 23** sind die Bindungskonstanten für die Bindung von rhBMP-2 an immobilisiertem PDLA dargestellt. Die Bindungskonstanten der Nukleations-Komplexe wurden aus der Auftragung der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen (**Abb. 62**) ermittelt. Die Bindungskonstanten der höheraffinen Konformationen wurden mit extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten berechnet. Als Basis für die Extrapolation nach dem Schema in **Abb. 66** dienten die Geschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^\gamma = 2,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ und $k_{-2}^\gamma = 1,6 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ aus dem Experiment in **Abb. 64**. Hierfür wurde angenommen, daß die Fluoreszenz des an PDLA adsorbierten rhBMP-2 in gleicher Weise vom Photobleaching und Fluoreszenzquenching beeinflusst wird, wie an Quarzglas gebundenes rhBMP-2. Die extrapolierten Konstanten sind mit

dem Index e gekennzeichnet. In **Tab. 23** sind die extrapolierten Konstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an PDLLA aufgelistet.

Tab. 23. Gegenüberstellung der kinetischen Konstanten für die Bindung ($pH = 4,5$) von rhBMP-2 an PDLLA und für die Elution mit PBS-Puffer bei $pH = 7,4$. *

Konformation	GG-Einstellung (Puffer)	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante [$M^{-1}s^{-1}$]	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante [s^{-1}]	Bindungskonstante [M^{-1}]
IA	bis 100 s (NaAc) $pH = 4,5$	$k_{+1} = 2,6 \pm 0,3 \cdot 10^4$	$k_{-1} = 6,6 \pm 3,3 \cdot 10^{-2}$	$K_I' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5$
III	500 s (PBS) $pH = 7,4$	$k_{+1} = 2,6 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-3}^\beta = 3,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \bullet$	${}^e K_{III}^{\beta'} = 6,9 \pm 0,9 \cdot 10^8 \bullet$
II	19 h (PBS) $pH = 7,4$	$k_{+1} = 2,6 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-2} = 1,7 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	${}^e K_{II}' = 1,5 \pm 0,3 \cdot 10^8$
IV	$pH = 7,4$	$k_{+1} = 2,6 \pm 0,3 \cdot 10^4$	${}^e k_{-4} = 2,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-7}$	${}^e K_{IV}' = 9,5 \pm 1,4 \cdot 10^{10}$

* Bei den Adsorptionsexperimenten erfolgte die Gleichgewichtseinstellung während der Adsorption. Die Elution erfolgte mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$). In der ersten Spalte stehen die Bezeichnungen der rhBMP-2-Konformationen. Index e : nach dem Schema in **Abb. 66** extrapolierte Konstanten. \bullet Ohne Berücksichtigung von Quenchfaktoren. Mit Berücksichtigung der Quenchfaktoren aus **Abb. 65** (Bereich **B**) ergibt sich die Bindungskonstante ${}^e K_{III}' = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^8$. Fehler für die Sorptionskonstanten: $\bar{x} \pm S.E.$. Fehler für die Bindungskonstanten: $y \pm \Delta y$.

Die Konformation I besitzt die niedrigste Affinität, welche um drei Zehnerpotenzen niedriger ist als die nächst höheraffine Konformation II. Die Konformation IV besitzt eine um 6 Zehnerpotenzen höhere Affinität als der Nukleations-Komplex I.

5.6 Vergleich von Adsorptionskinetiken für die Bindung von rhBMP-2 an Oberflächen mit unterschiedlicher Hydrophilie

In den meisten Fällen erfolgen biologische Reaktionen an Oberflächen und Grenzflächen zu wässrigen Systemen [262]. Biologische Reaktionen sind nur möglich, wenn sich innerhalb kürzester Zeit eine Hydrathülle auf der Oberfläche ausbilden kann, was wiederum die Voraussetzung für eine Proteinadsorption ist, die, wie in der Medizin oft gefordert, ein Zellwachstum erlaubt [263]. Bei den Untersuchungen konnte die Adsorption von rhBMP-2 an hydrophilen Oberflächen bestätigt werden, doch wurde auch gefunden, daß das Knochenwachstumsprotein rhBMP-2 ebenfalls an Oberflächen adsorbieren kann, die die Ausbildung einer Hydrathülle nicht begünstigen, also eine geringe Hydrophilie oder gar Hydrophobie zeigen. Die Klassifizierung der Oberflächen erfolgte in der vorliegenden Arbeit über die Randwinkel (**Kap. 2.10**), welche nach der Wilhelmy-Plate-Methode (**Kap. 3.3.5.1**) bestimmt

wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde immer die gleiche rhBMP-2-Konzentration mit $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt und alle Adsorptionsexperimente unter denselben Bedingungen durchgeführt (siehe Legende unter **Abb. 35**). Die Ergebnisse aus diesen Experimenten sind in **Tab. 24** aufgeführt.

Tab. 24. Randwinkel der verwendeten Oberflächen und Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten für eine rhBMP-2-Konzentration von $c = 3,85 \mu\text{mol/l}$.

Oberfläche	Randwinkel (Vorrückwinkel)	Randwinkel in der Literatur	$k_{obs} [\text{s}^{-1}]$
natives Quarzglas, Tab. 3 A	$0^\circ \pm 0^\circ$	$\theta_{adv} = 0 \pm 15^\circ$ [22] $\theta_{adv} = 0 \pm 10^\circ$ [$\theta_{adv} = 0 - 5^\circ$ [264] $\theta = 11 \pm 6^\circ$ [265] *	$0,1981 \pm 0,0061$
(3-Aminopropyl)- triethoxysilan, Tab. 3 B	$52^\circ \pm 2^\circ$	$\theta = 47^\circ$ [266] * $\theta_{adv} = 52 \pm 2^\circ$ [227]	$0,1401 \pm 0,0068$
Trichlorhexylsilan Tab. 3 C	$104^\circ \pm 2^\circ$	keine Literaturdaten	$0,1924 \pm 0,0087$
Poly-DL-laktid, Tab. 3 D	$82^\circ \pm 2^\circ$	$\theta_{adv} = 67,5^\circ$ [267]	$0,2010 \pm 0,0056$
Polyglutamat und Poly-L-lysin, Tab. 3 E	nicht bestimmt	$\theta_{adv} = 33^\circ$ bis 63° [229]***	$0,1174 \pm 0,0242$ ** $0,0122 \pm 0,0005$ **

* Randwinkel über Sessile Drop Methode [204,205], alle anderen über Wilhelmy-Plate-Methode [206,207]. ** k_{obs} -Werte aus Anpassung an eine zweifach exponentielle Funktion. *** Randwinkel für PLL und Chondroitinsulfat.

Obwohl sich die Randwinkel von nativem Quarzglas mit $\theta_{adv} = 0 \pm 0^\circ$ und PDLLA mit $\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$ sehr stark unterscheiden, wurde an beiden Oberflächen im Adsorptionsgleichgewicht die gleiche Fluoreszenz gemessen (**Abb. 35** und **38**). Da in beiden Experimenten (**Abb. 35** und **38**) die Streuung gleich war (nicht abgebildet), ist davon auszugehen, daß die gleiche Menge des Proteins auf der Oberfläche adsorbiert wurde. Wahrscheinlich liegen aber unterschiedliche Wechselwirkungen (siehe **Kap. 2.8**) vor. Alle Adsorptionsexperimente wurden bei einem pH -Wert von 4,5 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sind die Aminogruppen im rhBMP-2 protoniert. Die Protonierung der Peptidgruppen ist wegen der Mesomeriestabilisierung nicht möglich. Die Sauerstoffatome sind negativ polarisiert und die Carboxygruppen negativ geladen. Die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas erfolgt wahrscheinlich über Wasserstoffbrückenbindungen, indem es mit den Hydroxylgruppen auf der Quarzglasoberfläche wechselwirkt. An PDLLA-Oberflächen wurden Randwinkel von

$\theta_{adv} = 82 \pm 2^\circ$ gemessen. Das PDLLA ist wahrscheinlich über Wasserstoffbrückenbindungen am Quarz gebunden, so daß die hydrophoben Methyl- und Methylengruppen nach außen weisen (**Tab. 3**). Damit können nur hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem rhBMP-2 und den Methyl- und Methylengruppen des PDLLA stattfinden. Beim APS [225,226] liegen bei einem *pH*-Wert von 4,5 positiv geladene Aminogruppen und hydrophobe Propylgruppen vor. Das rhBMP-2 bindet offensichtlich über Wasserstoffbrückenbindungen und über hydrophobe Wechselwirkungen an APS [268]. Der kleinere k_{obs} -Wert könnte darauf hindeuten, daß beide Wechselwirkungen sich negativ beeinflussen und es zu einer Verlangsamung der Adsorption kommt. Die Bindung des rhBMP-2 an THS erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen. Überraschend ist, daß es überhaupt zu einer Bindung kommt, da die stark hydrophobe THS-Oberfläche mit $\theta_{adv} = 104 \pm 2^\circ$ nicht von der rhBMP-2-Lösung benetzt wird. Für die Bindung des Proteins an Multilayern, bestehend aus wechselnden Schichten von PLL und PGA (**Abb. 39**), wurden die beiden Geschwindigkeitskonstanten $k_{obs,A} = 0,1174 \pm 0,0242 \text{ s}^{-1}$ und $k_{obs,B} = 0,0122 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$ gefunden, die auf zwei parallel verlaufende Adsorptionsprozesse hinweisen. Zusammenfassend kann vermutet werden, daß für die Bindung von rhBMP-2 der Randwinkel von Oberflächen keine Rolle spielt. Sowohl bei Quarz-, THS- als auch PDLLA-Oberflächen stehen für die Bindung des Proteins entweder nur hydrophile oder nur hydrophobe Bindungsstellen zur Verfügung. Bei APS- oder PLL/PGA-Oberflächen wird durch das Vorhandensein von hydrophilen und hydrophoben Bindungsstellen auf der Oberfläche, die Bindung des Proteins beeinträchtigt.

Offensichtlich bindet das Protein an PGA anders als an PLL. Es wurde angenommen, daß der größere k_{obs} -Wert für die Bindung an der außenliegenden PLL-Schicht gilt. Die Bindung an PGA verläuft wegen sterischer Hinderung durch die oberste PLL-Schicht deutlich langsamer. In beiden Fällen liegen wohl auch hier Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und PGA bzw. PLL vor. Im Adsorptionsgleichgewicht wurde eine deutlich höhere Fluoreszenz bei der Adsorption von rhBMP-2 an Multilayern gefunden. An den o. a. Multilayern bindet 4,5 mal soviel rhBMP-2 wie an ultrahydrophilem Quarzglas und 11 mal soviel wie an APS (**Tab. 9**), allerdings unter der Annahme, daß bei beiden Experimenten ein gleich großer Streulichtanteil vorliegt.

5.7 Berechnung der Oberflächenkonzentration von rhBMP-2

Die Adsorption des Proteins an der Oberfläche wurde am TIRF-Rheometer über die Messung der Fluoreszenz beobachtet. Die Berechnung der adsorbierten Proteinmenge aus der Fluoreszenz wurde umfangreich von Hlady [20] beschrieben. Nach dieser Methode berechnete Oberflächenkonzentrationen finden sich z. B. in den Arbeiten [22,40,42,146,237,269]. Dort wurden die Oberflächenkonzentrationen mit Gl. 36 berechnet. Die Fluoreszenz N_a des adsorbierten Proteins (beachte Gl. 20) kann direkt am TIRF-Rheometer gemessen werden; die Eindringtiefe wird mit Gl. 12 berechnet und die Proteinkonzentration c_p sollte ohnehin bekannt sein. Die einzige Unbekannte in Gl. 36 ist N_b^e , der evaneszente Anteil der Bulkphasenfluoreszenz des gelösten Proteins. Aus der Gesamtfluoreszenz N_b^{tot} (Gl. 21), welche beim Bufferflush (**Abb. 7**) direkt am TIRF-Rheometer als Fluoreszenzabfall gemessen werden kann, ist nach Zerlegung in seine Fluoreszenzanteile (**Abb. 52**) der N_b^e -Wert bestimmbar. Die Messung der Gesamtfluoreszenz N_b^{tot} ist aber nur bei ausreichend hohen Proteinkonzentrationen möglich. Mit rhBMP-2-Lösungen führte ein Bufferflush nur bei Konzentrationen ab $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ zu einem Fluoreszenzabfall (**Abb. 51**), wobei wegen des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses die Gesamtfluoreszenz und der daraus folgende N_b^e -Wert einen beträchtlichen Fehler aufweisen, siehe **Tab. 13**. Höhere rhBMP-2-Konzentrationen, die beim Bufferflush einen größeren Fluoreszenzabfall herbeiführen sollten, konnten aber wegen mangelnder Löslichkeit des Proteins in NaAc-Puffer nicht untersucht werden (Löslichkeitsgrenze liegt bei etwa $c_p = 20 \mu\text{mol/l}$). Bei Fibrinogen führt schon bei Konzentrationen ab $c = 0,41 \mu\text{mol/l}$ der Bufferflush zu einem signifikanten Fluoreszenzabfall [40].

Für eine rhBMP-2-Lösung mit $c_p = 12,69 \mu\text{mol/l}$ wurde am TIRF-Rheometer beim Bufferflush ein Fluoreszenzabfall von N_b^{tot} gemessen, der in etwa halb so groß ist wie die gemessene Fluoreszenz N_s^{tot} einer 5-Hydroxy-L-tryptophanlösung mit $c_s = 98,78 \mu\text{mol/l}$ (siehe **Tab. 13**). Für den Unterschied der gemessenen Gesamtfluoreszenzen N_b^{tot} (rhBMP-2) und N_s^{tot} (5-Hydroxy-L-tryptophan) ist das Fluoreszenzquenching verantwortlich. Eine photochemische Zerstörung kann wegen der kurzen Meßzeiten (wenige Sekunden) ausgeschlossen werden. Die gemessenen Gesamtfluoreszenzen der Proteinlösungen (N_b^{tot}) bzw. die daraus folgenden N_b^e -Werte (Gl. 21 und **Abb. 52**) müssen mit dem Faktor f_K (**Kap. 4.4.1**) korrigiert werden. Die großen Fehler der N_b^e -Werte von etwa 10 % (siehe **Tab. 13**) führen zu einer großen Streuung der mit Gl. 36 berechneten Beladungen und sorgen dafür, daß die Adsorptionskinetiken **A** bis **C** in **Abb. 54** weit auseinanderliegen.

Um die große Fehlerstreuung zu umgehen, wurde ein Verfahren entwickelt, das ohne den Bufferflush auskommt, allerdings nur für rhBMP-2 experimentell bestätigt wurde. Bei Fibrinogen führt diese Methode allerdings zu falschen Ergebnissen. Zur Ermittlung der N_b^e -Werte sind bei der Kreuzmethode nur die Extinktionskoeffizienten des Proteins und des Standards (**Abb. 23**), die über den Umrechnungsfaktor $f_F = 7,783$ (**Kap. 3.3.5.2**) zusammenhängen, und die am TIRF-Rheometer gemessenen Gesamtfluoreszenzen der Standards (N_s^{tot} -Werte) (**Abb. 24**), die in ihre Fluoreszenzanteile zerlegt werden (**Abb. 52**), aber nicht die Fluoreszenz der rhBMP-2-Lösungen erforderlich. In **Kap. 4.4.2** ist die Ermittlung des N_b^e -Wertes ohne Durchführung des Bufferflushs beschrieben. Das neue Verfahren wurde als Kreuzmethode bezeichnet. Die Kreuzmethode führt zu N_b^e -Werten und Korrekturfaktoren, die eine vernachlässigbar geringe Fehlerstreuung (2%) aufweisen (**Tab. 14**). Die Betrachtung der Adsorptionskinetiken **D** bis **F** in **Abb. 54** verdeutlicht die sehr geringe Streuung eindrucksvoll.

Die Kreuzmethode bietet bei der Bestimmung der N_b^e -Werte gegenüber der Bufferflushmethode erhebliche Vorteile. Ein Vorteil liegt in der Material- und Zeitersparnis, da die Kreuzmethode keinen Bufferflush erfordert. Mit der Kreuzmethode können auch für sehr geringe Konzentrationen verlässlich die N_b^e -Werte ermittelt werden. Die Fehlerstreuung liegt bei den N_b^e -Werten nur bei 1 % (**Tab. 14**) und beim Bufferflush bei etwa 10 % (**Tab. 13**). Bei der Bufferflushmethode wird der N_s^e -Wert durch Lotfällung, ausgehend vom am TIRF-Rheometer gemessenen N_s^{tot} -Wert, in Richtung N_s^e -Gerade (siehe **Abb. 52**) erhalten. Üblicherweise liegen die N_s^{tot} -Werte, die für die Ermittlung der N_s^e -Werte erforderlich sind, im nichtlinearen Bereich (**Abb. 53**). Doch ist gerade in diesem Bereich eine hohe Genauigkeit der Gesamtfluoreszenzkurve (N_s^{tot} -Kurve) erforderlich, welche aber nicht zu erzielen ist, da mit abnehmender Konzentration bei der Messung der Fluoreszenzen am TIRF-Rheometer das Signal-Rausch-Verhältnis immer ungünstiger und deshalb der Fehler der Fluoreszenz größer wird. Für die Bestimmung des N_b^{tot} -Wertes der Proteinlösung über den Bufferflush und den daraus ermittelbaren N_b^e -Wert (evaneszenter Anteil der Fluoreszenz des Proteins in der Bulkphase) gilt dasselbe. Mit der Kreuzmethode können aus diesem Bereich die Fluoreszenzbestandteile der Proteinlösung ohne Messung aus **Abb. 53** erhalten werden. Da bei der Kreuzmethode zur Ermittlung der evaneszenten Anteile des Standards und des Proteins aus **Abb. 53** ohnehin nur die Vertikalen erforderlich sind, die durch die gemessenen Extinktionen beider Stoffe begrenzt werden, reicht es aus, zur Konstruktion der N_s^e -Geraden nur sehr hohe Standardkonzentrationen

zu vermessen und auf den Bufferflush zu verzichten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge des adsorbierten rhBMP-2 mit der Kreuzmethode berechnet.

5.8 Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas und an PDLLA

Zur Beschreibung der Affinität von Proteinen werden die Bindungskonstanten verwendet, die aus den Adsorptions- und Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten berechnet oder aus den Adsorptionsisothermen erhalten wurden. Die Nukleations-Komplexe wurden in der vorliegenden Arbeit als Konformation I bezeichnet. Die zusätzliche Unterteilung in IA und IB ergibt sich aus den beiden Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten, die nach Korrektur der Adsorptionskinetiken mit den Quenchfaktoren aus **Abb. 45** erhalten werden. Der Index A steht für die Konformation I, die schneller an der Oberfläche bindet, während der Index B für die langsamer adsorbierende Konformation I steht. Üblicherweise liegen die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten für verschiedene Proteine sehr nahe beieinander, wie die folgende Tabelle zeigt. Dies gilt auch für die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten von Proteinen bei der Adsorption an unterschiedlichen Oberflächen.

Tab. 25. Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1}) von Proteinen an (modifiziertem) Quarzglas

Protein an Substrat	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante [$\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	Quelle
rhBMP-2 an Quarz*	$1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$	Tab. 21
	$6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4$	
rhBMP-2 an PDLLA	$2,4 \pm 0,8 \cdot 10^4$	Tab. 23
	$1,4 \pm 0,3 \cdot 10^5$	
Fibrinogen an Quarz	$3,4 \pm 0,5 \cdot 10^5$, $9,9 \cdot 10^4$	[40,270]
Phosphorylase <i>b</i> an Quarz	$8,2 \pm 0,3 \cdot 10^5$	[22]
Avidin-FITC an Biotin*	$3,5 \pm 0,2 \cdot 10^4$	[237]
	$2,3 \pm 0,2 \cdot 10^5$	

* Adsorptionskinetiken an zweifach exponentielle Funktion anpaßbar, daraus folgen zwei Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten

Anders liegen die Verhältnisse bei den Bindungskonstanten. Sie weisen sehr große Unterschiede auf. Für die Bindung von Fibrinogen an Quarzglas wurden Bindungskonstanten zwischen $K' = 2,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ und $K' = 5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ [40] und für die Bindung von Avidin an Biotin $K' = 10 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}$ [271] angegeben. Die Größe der Bindungskonstanten wird hauptsächlich durch die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt. Die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der hochaffinen Konformationen, die direkt aus den Desorptionsexperimenten zugänglich sind, variieren im Vergleich zu den Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Nukleations-Komplexe um mehrere Zehnerpotenzen, siehe **Tab. 21** bis **23**.

Die Berechnung der Bindungskonstanten der hochaffinen Konformationen II, III und IV erfolgte im Falle der Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas mit den Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Nukleations-Komplexe IA und IB und für die Adsorption an PDLLA mit der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante des Nukleations-Komplexes I. Die Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas wurden zusätzlich mit A und B indiziert, je nachdem, ob sie mit den Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1A} oder k_{+1B} berechnet wurden. Es wurde angenommen, daß sich die Größe der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten der hochaffinen Proteinkonformationen II, III und IV im Bereich von den in **Tab. 25** angegebenen Größenordnungen bewegen.

5.8.1 Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas

Über Adsorptionsgeschwindigkeits- und Bindungskonstanten von rhBMP-2 an Oberflächen wurde in der Literatur bisher nicht berichtet. Dagegen findet sich eine Vielzahl von Untersuchungen zur Desorption von rhBMP-2. So liegen Freisetzungsstudien von rhBMP-2 z.B. von Knochenersatzmaterialien wie Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat [272,273] oder von Titan [229] vor.

Für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas wurden mehrere Bindungskonstanten zwischen $K_I' = 2,9 \pm 0,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (**Tab. 18**) bis $K_{IVA}' = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ (**Tab. 21**) gefunden. Die Bindungskonstanten beschreiben die Affinität der einzelnen Konformationen. Da nicht gesichert ist, ob die aufgefundenen Konformationen in einem globalen Minimum vorliegen, wurden die Bindungskonstanten mit einem Hochstrich gekennzeichnet. Für das Kontrollexperiment ergibt sich aus der Adsorptionisotherme in **Abb. 59** im Sättigungsgleichgewicht eine Beladung von $\Gamma_{max}^S = 0,44 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Diese liegt bereits bei einer

Proteinkonzentration von $c = 7,69 \mu\text{mol/l}$ vor. Das scheinbare Erreichen des Sättigungsgleichgewichtes ist wohl darauf zurückzuführen, daß für die Adsorptionsisotherme (Radioiodmethode) nur ein Wert für jede Konzentration zur Verfügung stand, im Vergleich zur Adsorptionsisotherme aus der TIRF-Methode (siehe **Abb. 59**).

Es wurde beobachtet, daß die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas hysteretisch abläuft. Die Adsorptionshysterese (siehe Schema in **Abb. 11**) ergibt sich aus dem Vergleich von **Abb. 35** und **Abb. 48**. Während bei der Adsorption (**Abb. 35**) die maximale Fluoreszenz bereits nach 30 s erreicht wird, findet bei den Desorptionsexperimenten in **Abb. 48** innert dieses Zeitraums praktisch kein Fluoreszenzabfall statt. Umfangreiche Untersuchungen zur Adsorptionshysterese finden sich in [32,175,274]. Bei hochaffinen Proteinen findet man eine starke Adsorptionshysterese und niedrige Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten, was auf eine hohe Anzahl von Bindungen des Proteins zur Oberfläche zurückgeführt werden kann. Die relativ großen Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Nukleations-Komplexe IA und IB von $k_{-IA} = 4,1 \pm 6,3 \cdot 10^{-2}$ (**Abb. 57**) und $k_{-IB} = 2,2 \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$ (**Abb. 58**) im Vergleich zu den Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der höheraffinen Konformationen, welche um bis zu fünf Zehnerpotenzen kleiner sind (**Tab. 21**), deuten auf eine geringe Irreversibilität hin. Häufig wird der Begriff Irreversibilität überansprucht und auch dann verwendet, wenn infolge des Erreichens der Nachweisgrenze, keine Veränderung mehr gemessen werden kann. Jennissen hat vorgeschlagen [4], den Begriff Irreversibilität nur für solche Reaktionen zu verwenden, für welche die Entropie eines irreversiblen Vorganges gemessen werden kann. Dies ist bei der Adsorption von Proteinen tatsächlich der Fall [32]. Bei den Betrachtungen im Zusammenhang mit dem Sättigungsgleichgewicht (siehe oben), kann infolge der Adsorptionshysterese kein wirkliches Gleichgewicht vorliegen, sondern nur ein sog. apparentes Gleichgewicht [159].

Bei Adsorptionsexperimenten mit niedrigen Proteinkonzentrationen erfolgt die Besetzung der Oberfläche nur langsam, siehe Adsorptionshalbwertszeiten in **Tab. 16**. Da auf der Oberfläche über einen langen Zeitraum nur wenige Moleküle gebunden sind, werden sie sich gegenseitig kaum beeinflussen, so daß das Proteinmolekül die Anzahl der Bindungen zur Oberfläche erhöhen kann. Die Erhöhung der Anzahl der Bindungen des Proteins zur Oberfläche kann durch Konformations- oder Orientierungsänderungen des Proteins erfolgen, wobei die höheren Domänen der Proteinstrukturen aufgebrochen und neue Bindungsstellen am Molekül exponiert werden können, die dann mit weiteren Bindungsstellen der Oberfläche reagieren [275]. Norde sieht bei der Adsorption von Proteinen an festen Oberflächen nur geringe Konformations-

änderungen, was er damit begründete, daß die Dicke der adsorbierten Proteinschicht in der Größenordnung des nativen Proteins liegt [276]. Die Triebkraft für Konformationsänderungen ist abhängig von vielen Faktoren, wie der Oberflächenkonzentration (Beladung) [32], der Adsorptionsgeschwindigkeit [277], der Anzahl der Bindungsstellen [32] und der Stabilität des Proteins an sich [278,279]. Die Erhöhung der Anzahl von Bindungen kann mit einer Aufspreitung des Proteinmoleküls auf der Oberfläche einhergehen und führt schließlich dazu, daß bei Verwendung von Lösungen mit niedrigen Proteinkonzentrationen, geringere Oberflächenkonzentrationen im apparenten Gleichgewicht gefunden werden als bei hohen Proteinkonzentrationen, siehe Isothermen in **Abb. 59**. Bei hohen Proteinkonzentrationen erfolgt eine rasche Besetzung der Oberfläche und das Protein kann wegen sterischer Hinderung nur eine begrenzte Anzahl an Bindungen zur Oberfläche ausbilden, so daß an der Oberfläche eine größere Anzahl von Proteinmolekülen gebunden werden kann [280]. Schematisch ist dies in **Abb. 67** dargestellt.

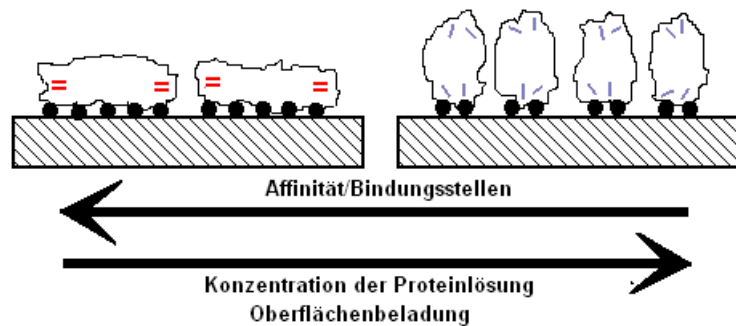


Abb. 67. Zusammenhang zwischen der Konzentration der Proteinlösung und der Oberflächenkonzentration (Beladung). Mit zunehmender Konzentration der Proteinlösung nimmt die Oberflächenbeladung zu und die Anzahl der Bindungen (schwarze Punkte) wegen sterischer Hinderung ab. Pfeilrichtung: Zunahme der betrachteten Parameter. Lila Striche: Tryptophanmoleküle (ohne Selfquenching). Rote Striche: Tryptophanmoleküle mit Selfquenching. Siehe nachfolgenden Text. (Modifizierte Abbildung aus [3]).

Aus den Auftragungen der $k_{obs,A}$ - bzw. $k_{obs,B}$ -Werte gegen die Proteinkonzentration (im folgenden kurz als Auftragung bezeichnet), wurden für die Nukleations-Komplexe die Bindungskonstanten $K'_{IA} = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (**Abb. 57**) und $K'_{IB} = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (**Abb. 58**) ermittelt. Erstere wurde der Konformation IA und zweite der Konformation IB zugewiesen. Beide Konformationen zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung mit der Bindungskonstante $K'_I = 2,9 \pm 0,5 \cdot 10^6$ aus der Adsorptionsisotherme des Kontrollexperimentes in **Abb. 59**. Da aus der Adsorptionsisotherme nur eine Bindungskonstante entnommen werden konnte, läßt sich diese keiner der beiden Bindungskonstanten K'_{IA} oder K'_{IB} eindeutig zuordnen. Überdies besitzen die Bindungskonstanten aus den Auftragungen sehr große Fehler, die von den großen

Fehlern der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten (siehe Legende unter **Abb. 57** und **58**) verursacht werden. Die relativen Fehler der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten für die Nukleations-Komplexe liegen zwischen 94 % und 155 %, während die Fehler der Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten mit etwa 4 % vernachlässigbar klein sind (**Tab. 17**). Die Bestimmung der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten der Nukleations-Komplexe aus den Auftragungen bereitet umso größere Probleme, je näher man an den Ursprung rückt. Die Untersuchung von sehr verdünnten Proteinlösungen würde diese Fehler zwar reduzieren, doch gelangt man bei der Messung von Adsorptionskinetiken in ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch eine eindeutige Anpassung unmöglich wird.

Hypothetisch kann das rhBMP-2-Molekül „end on“ (mit der Kopfseite, siehe **Abb. 67**, rechts) oder „side on“ (seitlich, siehe **Abb. 67**, links) auf die Oberfläche treffen. Die Betrachtung des rhBMP-2-Moleküls in **Abb. 2** zeigt, daß eine „end on“-Bindung wahrscheinlich zu einem sehr niederaffinen Nukleation-Komplex führen muß. Der Nachweis von Konformationen mit sehr niedrigen Affinitäten unterhalb von $K_I' = 10^5$ ist mit der TIRF-Spektroskopie nicht möglich. Die Bindungskonstanten K_{IA}' und K_{IB}' gelten wahrscheinlich für die Nukleations-Komplexe, die aus einer „side on“-Bindung hervorgehen. Daß „side on“-Bindungen stattfinden, kann durch die beobachtete Anomalie des Fluoreszenzquenchings (**Abb. 45**) gestützt werden. Üblicherweise nimmt das Fluoreszenzquenching mit zunehmender Oberflächenkonzentration, wie etwa bei der Adsorption von Phosphorylase *b* oder Fibrinogen an Quarzglas [40,146], zu. Beim Protein rhBMP-2 wurde das größte Fluoreszenzquenching bei Adsorptionen aus verdünnten Proteinlösungen festgestellt (**Abb. 45**), also wenn hochaffine Konformationen auf der Oberfläche entstehen. Hierbei führen die endständigen Tryptophangruppenpaare [251] (lila Striche in **Abb. 67**), die durch die hochaffine Bindung des Proteins in eine übereinanderliegende Position (rote Striche in **Abb. 67**) gedrängt werden [255,256], zu einem Selfquenching [134]. Bei der „end on“-Bindung kann keine Staffelung der Tryptophangruppen erfolgen, da ein Ende des rhBMP-2-Dimers von der Oberfläche wegweist und das andere wegen sterischer Hinderung durch hochaffin gebundene rhBMP-2-Konformationen kaum weitere Bindungen zur Oberfläche ausbilden kann (siehe oben).

Die höheraffinen Konformationen bilden sich aus den Nukleations-Komplexen IA und IB als Folge einer weiteren Erhöhung der Anzahl von Bindungen zur Oberfläche (Erhöhung der Affinität). Die Zunahme der Affinität verläuft nicht kontinuierlich, sondern durchläuft lokale Energieminima [4], siehe **Abb. 68**.

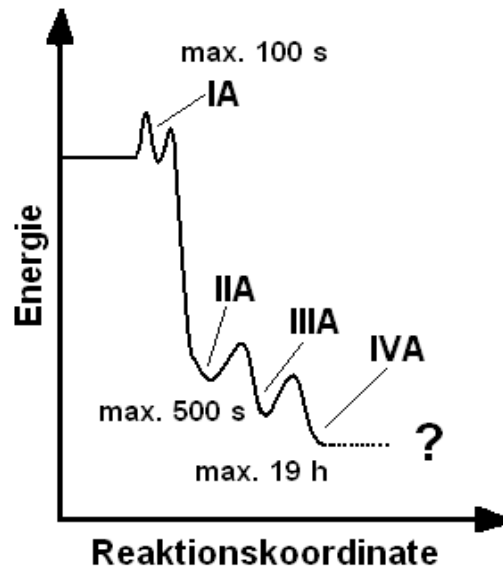


Abb. 68. *Hypothetisches Energieprofil für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas. Dargestellt sind nur die Konformationen, dessen Affinitäten mit $k_{+IA} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet wurden. Fragezeichen: Es ist nicht gesichert, ob bei der Konformation IVA ein globales Energieminimum vorliegt. Energieminima: lokale Minima der metastabilen Konformationen. Da nicht überprüft wurde, wann genau eine Konformation erstmals entsteht, wurden die Zeiten nicht weiter eingegrenzt. (Modifizierte Abbildung aus [4]).*

In **Abb. 68** ist ein hypothetisches Energieprofil für die bei der Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas stattfindenden Konformationsumwandlungen, ausgehend vom Nukleations-Komplex IA, dargestellt. Für die Entstehung der höheraffinen Konformationen aus dem Nukleations-Komplex IB, wurde das gleiche Energieprofil angenommen. Experimentell wurden verschiedene Konformationen nachgewiesen; eine exakte Zuordnung zu stabilen Konformationen (in **Abb. 11** die Buchstaben **A** und **B**) oder zu metastabilen Konformationen (in **Abb. 11** die Buchstaben **A'** und **B'**) konnte aber nicht getroffen werden. Das Vorhandensein von stabilen und metastabilen Konformationen ergibt sich als Konsequenz aus der Adsorptionshysterese. Wegen der Nichtzuordnbarkeit (stabil/metastabil) sollen in der vorliegenden Arbeit die Konformationen als metastabile Konformationen mit den entsprechenden apparenten Bindungskonstanten (K') verstanden werden, auch wenn weiterhin der Begriff Konformation verwendet wird. Im folgenden beziehen sich die weiteren Betrachtungen, der Übersichtlichkeit wegen, nur auf Konformationen, die in **Abb. 68** dargestellt sind, also mit A indiziert wurden. Für die Konformationen IB, IIB, IIIB und IVB werden aber die gleichen Umwandlungspfade ange-

nommen, da ihre Bindungskonstanten ähnlich hoch sind wie diejenigen der A-Konformationen (**Tab. 26**). Die Umwandlungen der A- und B-Konformationen verlaufen parallel. Das Energieminimum und Energiemaximum ist für den Nukleations-Komplex A gedrängter dargestellt, um zu verdeutlichen, daß er schneller entsteht als die höheraffinen Konformationen.

Für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas konnten mehrere Konformationen gefunden werden. Diese sind mitsamt ihrer Bindungskonstanten in **Tab. 26** in Reihenfolge ihres Anstiegs aufgeführt.

Tab. 26. rhBMP-2-Konformationen und ihre Bindungskonstanten. *

Konformation	Entnahmeort **	Bindungskonstante (M^{-1})
IB	<i>Abb. 58</i>	$K'_{IB} = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6$
IA	<i>Abb. 57</i>	$K'_{IA} = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6$
IIB	<i>Abb. 50 und 58</i>	$K'_{IIB} = 1,7 \pm 0,6 \cdot 10^9$
IIA	<i>Abb. 50 und 57</i>	$K'_{IIA} = 4,6 \pm 1,6 \cdot 10^9$
IIIB	<i>Abb. 48 und 58</i>	$K'^*_{IIIB} = 1,3 \pm 0,4 \cdot 10^{10} \#$
IIIA	<i>Abb. 48 und 57</i>	$K'^*_{IIIA} = 3,6 \pm 0,5 \cdot 10^{10} \#$
IVB	<i>Abb. 50 und 58</i>	$K'_{IVB} = 5,2 \pm 0,8 \cdot 10^{11}$
IVA	<i>Abb. 50 und 57</i>	$K'_{IVA} = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12}$

* Für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas (Elution mit PBS-Puffer, $pH = 7,4$). ** Der Entnahmeort verweist auf die Abbildungen, denen die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten zur Berechnung der Bindungskonstanten entnommen wurden. # Die Konstanten könnten den Einfluß des Photobleachings und Fluoreszenzquenchings beinhalten, beachte Legende unter **Tab. 21**. Fehlerangabe als $y \pm \Delta y$ (Fehlerfortpflanzungsgesetz).

Aus **Tab. 26** ist zu entnehmen, daß die Affinitäten der Nukleations-Komplexe (Konformationen) IA und IB um wenigstens drei Zehnerpotenzen niedriger sind als die Affinitäten der höheraffinen Konformationen. Innerhalb von bis zu 100 s entstehen die Nukleations-Komplexe. Die höheraffinen Konformationen IIA, IIB, IIIA und IIIB entstehen innerhalb von bis zu 500 s, möglicherweise aber schon während der Adsorption. Die Konformationen IIIA und IIIB könnten auch erst im Verlaufe der Desorption entstehen (*Abb. 68*), wenn durch die Freisetzung der Konformationen IIA und IIB freie Stellen auf der Oberfläche entstehen. Im Prinzip gilt für die höchstaffinen Konformationen IVA und IVB dasselbe wie für die Konformationen IIIA und IIIB. Sie entstehen nach etwa 19 h.

Im adsorbierten Zustand liegt rhBMP-2 in einer anderen Konformation vor als im gelösten Zustand (siehe Schema in **Abb. 69**). Ob die Freisetzung von hochaffinen rhBMP-2-Konformationen in der nativen Form (Buchstabe N in **Abb. 69**) erfolgt oder in der Konformation des gebundenen Proteins, darüber sind keine Literaturdaten bekannt. Deshalb ist in **Abb. 69** das freigesetzte Protein mit X gekennzeichnet. In **Abb. 69** ist ein Schema dargestellt, das die Umwandlung der einzelnen rhBMP-2-Konformationen IA, IIA, IIIA und IVA zeigt. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Umwandlung der einzelnen Konformationen ineinander sind mit einem Kreis gekennzeichnet.

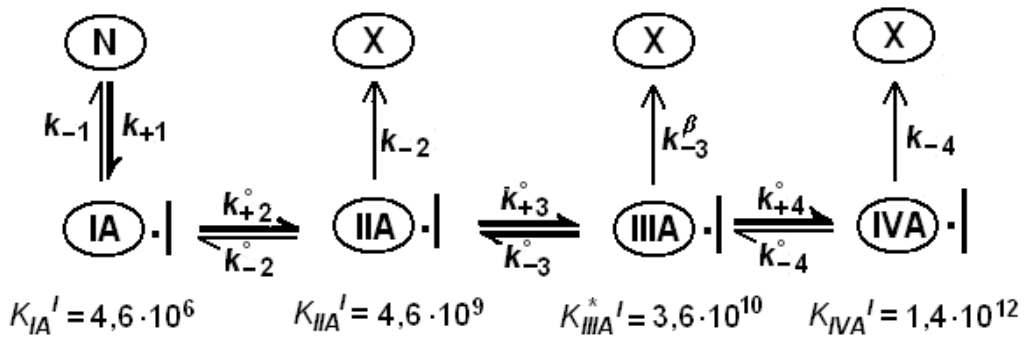


Abb. 69. Schema zur Umwandlung von rhBMP-2-Konformationen auf Quarzglas. Die Darstellung gilt für Konformationen, die mit $k_{+IA} = 1,9 \pm 0,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet wurden. Für Konformationen, die mit $k_{-IB} = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ berechnet werden, wird dasselbe Schema angenommen. (N): gelöstes, natives Protein. (IA): Nukleations-Komplex. (IIA), (IIIA) und (IVA): hochaffine Konformationen. (X): desorbiertes Protein. Weiteres zu den Konformationen, siehe Text weiter unten. | : Quarzglas mit Bindung zum Protein. Mit einem Kreis indizierte Konstanten beschreiben Geschwindigkeitskonstanten für Konformationsänderungen des Proteins auf der Oberfläche. An den senkrechten Gleichgewichtspfeilen sind die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten und unterhalb der Konformationen die Bindungskonstanten (siehe **Tab. 26**) aufgeführt.

In Lösung liegt das Protein vor der Adsorption (in **Abb. 69** sind die rhBMP-2-Moleküle als Ovale dargestellt; die Bezeichnung der Konformationen befindet sich in den Ovalen) in der nativen Form vor, wie sie in **Abb. 2** dargestellt ist. Bindet das Protein an der Quarzglasoberfläche, wandelt es sich in den Nukleations-Komplex IA um (siehe **Abb. 69**), dessen Affinität im apparenten Adsorptionsgleichgewicht $K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ist. Bereits nach etwa 500 s liegen nur noch die Konformationen IIA und IIIA mit den Affinitäten $K_{IIA}' = 4,6 \pm 1,6 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ und $K_{IIIA}^* = 3,6 \pm 0,5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (**Abb. 68**) vor. Die Reaktionsabfolge verläuft konsekutiv (**Abb. 10**). Nach 19 h Stunden wurde erneut die Konformation IIA und zusätzlich die Konformation IVA mit der Affinität $K_{IVA}' = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ gefunden. Die Konformation IIIA war überraschenderweise nicht mehr nachweisbar. Zwischen den Konformationen IIA und

IIIA wird auf der Quarzglasoberfläche ein schwach reversibles Gleichgewicht vermutet. Die Vermutung wird dadurch gestützt, da sich die Bindungskonstanten der Konformationen IIA und IIIA nur um den Faktor 8 voneinander unterscheiden (**Tab. 26**). Demgegenüber unterscheiden sich die Bindungskonstanten der Konformationen IIA bzw. IIIA um mehrere Zehnerpotenzen von den Bindungskonstanten des Nukleations-Komplexes und der Konformation IVA (**Tab. 26**). Aus diesem Grunde sind in **Abb. 69** zwei gleich starke Gleichgewichtspfeile zwischen den Konformationen IIA und IIIA eingezeichnet. Die Betrachtung der Spanwerte in **Abb. 60** zeigt, daß beim Experiment **B** in **Abb. 60** (500 s nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes) auf der Oberfläche 43 % der Konformation IIA und 57 % der Konformation IIIA vorliegen. Demgegenüber liegen auf der Oberfläche nach einer Inkubationsdauer von 19 h im Desorptionsexperiment **C** in **Abb. 60** 74 % der Konformation IIA und 26 % der Konformation IVA vor. Die Desorptionskinetik **A** (**Abb. 60**) liefert keinen Hinweis auf die Konformation IIIA (Kinetik nicht an eine dreifach exponentielle Funktion anpaßbar). Die Konformation IIIA wandelt sich wahrscheinlich nach mehreren Stunden sowohl in die Konformation IIA als auch in die Konformation IVA um.

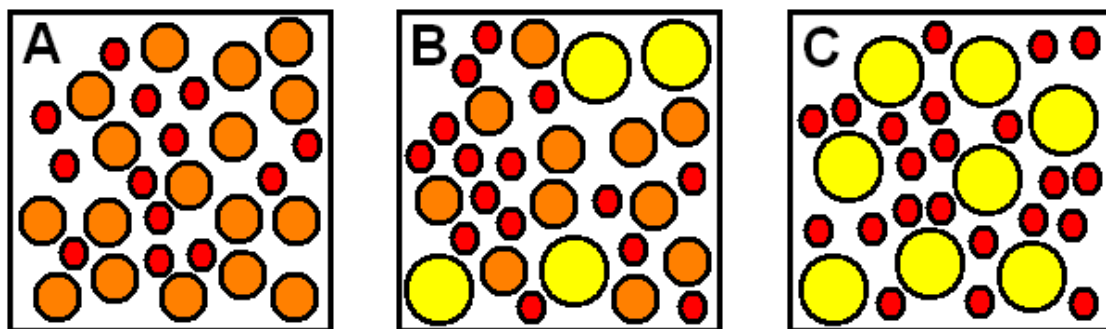


Abb. 70. Schema zur Veränderung der Oberflächenbesetzung bei der Umwandlung hochaffiner rhBMP-2-Konformationen. Rot: Konformation IIA. Orange: Konformation IIIA. Gelb: Konformation IVA. **A:** Nach 500 s: 43 % IIA und 57 % IIIA (siehe Spanwerte in **Abb. 60**, Kinetik **B**). **B:** Zwischen 500 s und 19 h: 50 % IIA, 37 % IIIA und 13 % IVA (willkürliche Angabe, siehe Text unten). **C:** Nach 19 h: 74 % IIA und 26 % IVA (siehe Spanwerte in **Abb. 60**, Kinetik **C**). Erläuterungen, siehe folgenden Text.

In **Abb. 70** ist ein Schema dargestellt, daß die Umwandlungen der hochaffinen rhBMP-2-Konformationen IIA, IIIA und IVA veranschaulichen soll. Nach 500 s (**A** in **Abb. 70**) befinden sich auf der Oberfläche 43 % der rhBMP-2-Konformation IIA (rot) und 57 % IIIA (orange) (siehe Spanwerte in **Abb. 60**, Kinetik **B**). Zwischen den Konformationen IIA und IIIA liegt auf der Oberfläche ein schwach reversibles Gleichgewicht vor (**Abb. 69**). Das hat zur Folge, daß sich einerseits die Konformation IIIA in die Konformation IIA umwandelt, so daß freie Bindungsstellen auf der Oberfläche entstehen. Noch auf der Oberfläche gebundenes IIIA wandelt

sich irreversibel in die Konformation IVA (gelb) um. Daraus folgt, daß zwischen einem Zeitraum von 500 s und 19 h die Konformationen IIA, IIIA und IVA gleichzeitig auf der Oberfläche vorhanden sein sollten (**B** in **Abb. 70**). Durch die irreversible Bildung von IVA aus IIIA wird dem Gleichgewichtssystem zwischen IIA und IIIA zum einen die letztgenannte Konformation entzogen und zum anderen die Bindungsstellen auf der Oberfläche von der sich bildenden Konformation IV besetzt. Damit kann keine Rückumwandlung von IIA zu IIIA wegen sterischer Hinderung mehr stattfinden. Nach 19 h (**C** in **Abb. 70**) sind auf der Oberfläche 74 % IIA und 26 % IVA (siehe Spanwerte in **Abb. 60**, Kinetik **C**) aber kein IIIA mehr vorhanden. Die unter **B** in der Legende von **Abb. 70** angegebene Zusammensetzung sind willkürliche Werte, doch tragen sie dem Umstand Rechnung, daß sich im Laufe von 19 h die Konformation IIA auf der Oberfläche anreichert (vergleiche Spanwerte der Adsorptionskinetiken in **Abb. 60**). In **Abb. 60** sind Kinetiken dargestellt, die nach einer Adsorptionsgleichgewichtseinstellung von 500 s (Kinetik **B**) bzw. 19 h (Kinetik **C**) durchgeführt wurden. Ein Desorptionsexperiment (nicht durchgeführt) nach einer Gleichgewichtseinstellung zwischen 500 s und 19 h sollte zu einer Desorptionskinetik führen, die an eine dreifache exponentielle Funktion anpaßbar ist und auf der Oberfläche das in **Abb. 70 B** dargestellte Besetzungsschema (Spanverhältnisse) aufweist. Während der Konformationsumwandlungen (**Abb. 70**) ändert sich die Anzahl der adsorbierten Proteinmoleküle offensichtlich nicht, wie das Experiment zur Adsorptionsgleichgewichtseinstellung in **Abb. 47** zeigt. Anderfalls hätte man nach 47 h eine andere Fluoreszenz als zu Beginn des Experimentes gemessen.

Bisher wurden Bindungskonstanten besprochen, die mit den Geschwindigkeitskonstanten aus den Desorptionsexperimenten berechnet wurden, bei denen die Elution des rhBMP-2 mit PBS-Puffer ($pH = 7,4$) erfolgte. Die Elution des adsorbierten Proteins mit NaAc-Puffer ($pH = 4,5$) führt zu anderen Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten (**Tab. 22**) und damit zu anderen Bindungskonstanten. Die Berechnung der Bindungskonstanten erfolgte mit den Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten aus **Abb. 57** und **58**. Für die weiteren Betrachtungen wurde angenommen, daß die photochemische Zerstörung (Photobleaching) und das Quenchverhalten des rhBMP-2 bei der Elution mit NaAc-Puffer unverändert bleiben. Die Bezeichnung der Konformationen und der Bindungskonstanten sind in Reihung zunehmender Affinität in **Tab. 27** aufgeführt.

Tab. 27. rhBMP-2-Konformationen und ihre Bindungskonstanten. *

Konformation	Entnahmeort **	Bindungskonstante (M^{-1})
IB	<i>Abb. 58</i>	$K'_{IB} = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6$
IA	<i>Abb. 57</i>	$K'_{IA} = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6$
IIB	<i>Abb. 66 und 58</i>	${}^e K'_{IIA} = 2,1 \pm 0,2 \cdot 10^8$
IIA	<i>Abb. 66 und 57</i>	${}^e K'_{IIA} = 5,6 \pm 0,5 \cdot 10^9$
IIIB	<i>Abb. 66 und 58</i>	${}^e K'^*_{IIIB} = 5,8 \pm 0,8 \cdot 10^9 \#$
IIIA	<i>Abb. 66 und 57</i>	${}^e K'^*_{IIIA} = 1,6 \pm 0,2 \cdot 10^{10} \#$
IVB	<i>Abb. 66 und 58</i>	${}^e K'_{IVB} = 2,4 \pm 0,1 \cdot 10^{11}$
IVA	<i>Abb. 66 und 57</i>	${}^e K'_{IVA} = 6,4 \pm 0,4 \cdot 10^{11}$

* Für die Bindung von rhBMP-2 an ultrahydrophilem Quarzglas (Elution mit NaAc-Puffer, $pH = 4,5$). ** Der Entnahmeort verweist auf die Abbildungen, denen die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten zur Berechnung der Bindungskonstanten entnommen wurden. Mit dem Index e gekennzeichnete Konstanten wurden extrapoliert. Die mit e indizierten Konstanten könnten den Einfluß des Photo-bleachings und Fluoreszenzquenchings enthalten. # Beachte Legende unter **Tab. 22**. Fehlerangabe als $y \pm \Delta y$ (Fehlerfortpflanzungsgesetz).

Als Basis für die Extrapolation der Bindungskonstanten hochaffiner Konformationen wurden die experimentell ermittelten Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten $k_{-2}^{\gamma} = 4,6 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} s^{-1}$ und $k_{-3}^{\gamma} = 1,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ aus Kinetik **B** in *Abb. 61* verwendet, die entsprechend des Schemas in *Abb. 66* umgerechnet wurden. Aus diesem Grunde wurden die Bindungskonstanten mit dem Buchstaben e indiziert.

Mechanistisch scheint die Umwandlung der rhBMP-2-Konformationen auf der Oberfläche anders abzulaufen als es in *Abb. 69* und *70* dargestellt ist. Das saure Milieu stört das Gleichgewicht zwischen den Konformationen IIA und IIIA bzw. IIB und IIIB, so daß der Unterschied zwischen den Bindungskonstanten IIA und IIIA bzw. IIB und IIIB bei einem pH -Wert von 7,4 nicht mehr 8 beträgt (**Tab. 26**), sondern bei einem pH -Wert von 4,5 auf den Faktor 28 (**Tab. 27**) ansteigt. Weiterhin sorgt das saure Milieu für eine Umkehrung der Konformationszusammensetzung (Spanverhältnisse) auf der Oberfläche von 45 % Konformation IIA bzw. IIB und 55 % Konformation IIIA bzw. IIIB (Kinetik **A** in *Abb. 61*, Elution bei $pH = 7,4$) auf 55 % Konformation IIA bzw. IIB und 45 % Konformation IIIA bzw. IIIB (Kinetik **B** in *Abb. 61*, Elution bei $pH = 4,5$). Die Affinität der Konformationen IIA bzw. IIB ist bei $pH = 4,5$ um den

Faktor 8 geringer als bei $pH = 7,4$ (vergleiche **Tab. 26** mit **27**). Bei den Konformationen IIIA bzw. IIIB und IVA bzw. IVB unterscheiden sich die Affinitäten nur noch um den Faktor 2. Daraus kann geschlossen werden, daß mit zunehmender Affinität der Einfluß des pH -Wertes in den Hintergrund rückt.

5.8.2 Bindungsmodelle für die Adsorption von rhBMP-2 an hydrophobem PDLLA

Für die Bindungsstudien von rhBMP-2 an einer PDLLA-Oberfläche wurde für den niederaffinen Nukleations-Komplex angenommen, daß das Photobleaching unabhängig davon ist, an welcher Oberfläche es gebunden ist. Der Vergleich der Bindungskonstante des Nukleations-Komplexes (mit Berücksichtigung des Photobleachings) für die Bindung von rhBMP-2 an PDLLA von $K'_I = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (**Tab. 20**) mit derjenigen für die Bindung des Proteins an Quarzglas von $K'_I = 1,3 \pm 5,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (**Tab. 17**) zeigt, daß die Affinität des Proteins zur PDLLA-Oberfläche um den Faktor 33 geringer ist als zu Quarzglas (vergleiche **Tab. 20** und **17**). Wie **Abb. 45** zeigt, ist das Fluoreszenzquenching bei hohen Beladungen gering. Hohe Beladungen resultieren aus der Anwendung konzentrierter rhBMP-2-Lösungen, die wiederum die Ausbildung niederaffiner Konformationen, wie in **Abb. 67** dargestellt, begünstigen. Da der Nukleations-Komplex von rhBMP-2 an PDLLA eine sehr geringe Affinität besitzt, ist das Vorhandensein gestaffelter Tryptophanringe sehr unwahrscheinlich. Aus diesem Grunde wird vermutet, daß das Fluoreszenzquenching nur eine geringe Rolle spielt. Ein vernachlässigbares Fluoreszenzquenching wurde beim Nukleations-Komplex auch für die Adsorption von Phosphorylase *b* an Quarzglas beschrieben [281]. Aus der Adsorptionsisotherme in **Abb. 63** ergibt sich die Bindungskonstante $K'_I = 5,9 \pm 2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, die eine hohe Übereinstimmung mit der o. a. Konstante aus der Auftragung k_{obs} vs. c (**Abb. 62**) besitzt.

Die Bindungskonstanten der höheraffinen Konformationen wurden nach dem Schema in **Abb. 66** berechnet, da vorausgesetzt wurde, daß an PDLLA gebundenes rhBMP-2 das gleiche Photobleachverhalten aufweist wie an Quarz gebundenes rhBMP-2. Grundlage für die Berechnung ist das Desorptionsexperiment in **Abb. 64**. In **Tab. 28** sind die Bindungskonstanten aller gefunden und extrapolierten Konformationen zusammengetragen.

Tab. 28. rhBMP-2-Konformationen und ihre Bindungskonstanten. *

Konformation	Entnahmeort **	Bindungskonstante (M^{-1})
I	<i>Abb. 62</i>	$K_I' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5$
II	<i>Abb. 66</i> und <i>62</i>	${}^e K_{II}' = 1,5 \pm 0,3 \cdot 10^8$
III	<i>Abb. 66</i> [#] und <i>62</i>	${}^e K_{III}' = 6,9 \pm 0,3 \cdot 10^8$ [#]
IV	<i>Abb. 66</i> und <i>62</i>	${}^e K_{IV}' = 9,5 \pm 1,4 \cdot 10^{10}$

* Für die Bindung von rhBMP-2 an PDLA (Elution mit PBS-Puffer). ** Der Entnahmeort verweist auf die Abbildungen, aus denen die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten zur Berechnung der Bindungskonstanten entnommen wurden. Die mit *e* indizierten Konstanten wurden extrapoliert und könnten den Einfluß des Photo-bleachings und Fluoreszenzquenchings enthalten. [#] Beachte Legende unter **Tab. 23**. Fehlerangabe als $y \pm \Delta y$ (Fehlerfortpflanzungsgesetz).

Alle rhBMP-2 Konformationen besitzen zu PDLA eine Affinität, die um etwa eine Zehnerpotenz geringer ist als zu Quarzglas. Für die Konformationsumwandlungen des rhBMP-2 auf der PDLA-Oberfläche wurde ein ähnlicher Ablauf angenommen, wie es im Schema in *Abb. 69* dargestellt ist. Die Bindungskonstanten für die Konformationen II und III unterscheiden sich nur um den Faktor 5 (**Tab. 28**). Für die Bindung an Quarzglas beträgt dieser Unterschied 8 (Elution mit PBS, **Tab. 26**) bzw. 28 (Elution mit NaAc, **Tab. 27**). Die Reversibilität der Konformationen II und III ist auf der PDLA-Oberfläche stärker ausgeprägt als auf Quarzglas.

Offensichtlich besitzt auf Quarzglas immobilisiertes PDLA eine „weiche“ Oberfläche. Die Oberflächenstruktur ist dagegen auf ultrahydrophilem Quarzglas sehr rigide. Bei der Bindung von rhBMP-2 an PDLA werden wahrscheinlich die Überstrukturen des Proteins weniger beeinflusst als bei der Bindung an Quarzglas. Ein Hinweis darauf liefern die kleineren Bindungskonstanten der Nukleations-Komplexe (**Tab. 28**). Die Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht beträgt $\Gamma_{max}^S = 0,41 \pm 0,04 \cdot 10^4 \mu g/cm^{-2}$.

5.8.3 Vergleich der Bindungskonstanten von rhBMP-2 an Quarzglas und PDLA mit Bindungskonstanten anderer Proteine

In der Literatur wurden bisher keine Bindungskonstanten für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas bzw. an PDLA veröffentlicht, weshalb ein Vergleich ausbleiben muß. Für die rhBMP-2-Nukleations-Komplexe wurden in der vorliegenden Arbeit die Bindungskonstanten $K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6 M^{-1}$ und $K_{IB}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6 M^{-1}$ (für die Adsorption an Quarzglas, siehe

Tab. 26) und $K_f' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (für die Adsorption an PDLLA, siehe **Tab. 28**) gefunden und entsprechen von der Größenordnung den Bindungskonstanten aus **Tab. 29**. Die Bindungskonstanten der Nukleations-Komplexe von Phosphorylase *b* (**Tab. 29**) erstrecken sich von $K' = 1,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Adsorption an Butyl-N-Sepharose ($\Gamma = 64 \text{ nmol/m}^2$)) über $K' = 1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Adsorption an Butyl-N-Sepharose ($\Gamma = 269 \text{ nmol/m}^2$)) bis zu $K' = 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Adsorption an Quarzglas). In vorgenannter Reihenfolge nimmt die Zahl der Bindungen von Phosphorylase *b* zum Substrat zu.

Tab. 29. Bindungskonstanten von Nukleations-Komplexen an Oberflächen.*

Protein	Substrat	Methode	Bindungs-konstante (M^{-1})	Literatur
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Alginatsulfat	SPR	$6,96 \cdot 10^6$	[282]
Transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)	Alginatsulfat	SPR	$3,53 \cdot 10^7$	[282]
Fibrinogen	Quarz	TIRF	$2,5 \cdot 10^7$	[40]
Phosphorylase <i>b</i>	Quarz	TIRF	$3 \cdot 10^7$	[40]
Phosphorylase <i>b</i>	Butyl-N-Sepharose ($\Gamma = 64 \text{ nmol/m}^2$)	BB *	$1,8 \cdot 10^4$	[32]
Phosphorylase <i>b</i>	Butyl-N-Sepharose ($\Gamma = 269 \text{ nmol/m}^2$)	BB *	$1,6 \cdot 10^5$	[32]
hum. Immunglobulin G (IgG)	biotinyl. <i>Staphylococcus aureus</i>	BLI	$1,5 \cdot 10^9$	[283]
Avidin-FITC**	Biotin**	TIRF	$9,0 \cdot 10^6$	[237]
			$2,5 \cdot 10^7$	
Biotin**	Streptavidin**	SPR	$4,2 \cdot 10^5$	[242]
			$1,2 \cdot 10^6$	

* SPR: Oberflächenplasmonresonanz. TIRF: Totale innere Reflexionsfluoreszenzspektroskopie. BB: Bindungsstudien im Batchverfahren. BLI: Biomolekulare Interferometrie. ** Hierzu, siehe **Kap. 5.9**.

Die Bindungskonstanten für die Bindung von rhBMP-2 an Quarzglas sind um etwa ein bis zwei Zehnerpoten kleiner als für die Bindung von Phosphorylase *b* oder Fibrinogen an Quarzglas. Da rhBMP-2 mit 25,8 kDa [59] deutlich kleiner ist als Fibrinogen mit 340 kDa [284] oder Phosphorylase *b* mit 195 kDa [285] kann man annehmen, daß rhBMP-2 weniger Bindungsstellen besitzt als Phosphorylase *b* oder Fibrinogen.

5.9 Vergleich von Adsorptionsstudien zwischen TIRF- und SPR-Spektroskopie

Zur Untersuchung von Adsorptionskinetiken wird eine Vielzahl von Technologien eingesetzt. Die weiteste Verbreitung hat die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) gefunden, welche erstmals 1968 realisiert wurde [15,16]. Die SPR soll in diesem Kapitel verglichen werden mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten TIRF-Spektroskopie. Für beide Methoden, SPR und TIRF, wird eine Durchflußzelle [16,286] verwendet.

Bei der Adsorption von hochaffinen oder großen Molekülen ist die Transportlimitierung das Hauptproblem. Dies führt üblicherweise zu Adsorptionskinetiken, die teilweise linear oder sigmoidal verlaufen, und nicht, wie manchmal bei der Verwendung von hochkonzentrierten Proteinlösungen, an exponentielle Funktionen angepaßt werden können. Jennissen und Zumbrink [41] berichteten schon im Jahre 1998 über die Beseitigung der Transportlimitierung am TIRF-Rheometer, indem sie die Proteinlösung mit einer vorangehenden Luftblase in die Meßzelle einleiteten. Hierdurch wurde die Nernstsche Diffusionsschicht auf bis zu 200 nm reduziert, was zu einer Erhöhung der Transportgeschwindigkeit um den Faktor 50 führte [22,40]. Die Adsorptionskinetiken konnten deshalb an exponentielle Funktionen angepaßt werden. Auch bei der SPR sind seit vielen Jahren Bestrebungen im Gange, die Transportlimitierung zu reduzieren. So wird die Geometrie der Meßzelle dahingehend verändert, daß diese flacher konstruiert wird, um den Diffusionsweg der Proteinmoleküle zu verringern. Heutige SPR-Meßzellen besitzen eine Dicke von 10 bis 100 µm [35]; die Dicke der Diffusionsschicht liegt bei etwa 5 bis 50 µm [42]. Die Stabilisierung des Fließzustandes wird durch eine längere Ausgestaltung der Meßzelle erreicht [36]. Eine Erhöhung des Volumenstroms trägt zusätzlich zu einer Reduktion der Transportlimitierung bei [37,38]. Überdies wird über die Reduktion der Bindungsstellen auf der Sensoroberfläche versucht, die Reaktionsgeschwindigkeit herabzusetzen [39], was allerdings mit der Verringerung der Sensitivität erkaufte wird. Diese Verbesserungen trugen erfolgreich zu einer Verkürzung von Adsorptionszeiten bei. Dennoch führen diese Methoden nicht zu einer signifikanten Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht bzw. Transportlimitierung, insbesondere wenn große Moleküle mit einer hohen Affinität untersucht werden sollen. Über eine deutliche Reduktion der Nernstschen Diffusionsschicht bei der SPR berichtete erstmals D'Agata [242], die aber nicht so weitgehend war, daß die erhaltenen Adsorptionskinetiken an exponentielle Funktionen angepaßt werden konnten.

Den auffälligsten Unterschied zwischen den Adsorptionskinetiken aus der TIRF- und der SPR-Spektroskopie findet man in der deutlich längeren Adsorptionsdauer bei der SPR. In der vorliegenden Arbeit dauerte die Einstellung des apparenten Adsorptionsgleichgewichtes im

TIRF-Rheometer zwischen 3 s (**Abb. 44**) und 100 s (**Abb. 43**). Bei der SPR dauert eine Adsorption wenigstens 100 s bei Verwendung einer vorangehenden Luftblase bei der Einleitung der Proteinlösung [242]. Allerdings stellt die Verwendung einer Luftblase bei der SPR die absolute Ausnahme dar. In optimierten SPR-Zellen (siehe oben) liegt die Adsorptionsdauer zwischen 150 s [287] und mehreren Minuten [288-292]. Die Unterschiede bei den Adsorptionsdauern sind ausschließlich auf die Transportlimitierung zurückzuführen. Über Adsorptionskinetiken, die mit der SPR gemessen und an exponentielle Funktionen angepaßt wurden, liegen keine Veröffentlichungen vor. Die Anpassung der SPR-Kinetiken erfolgt mit einem Global Fit [18]. Der Global Fit führt zu einer sehr guten Anpassung, bei welcher sich die berechnete Anpassungskurve über die gesamte Kinetik erstreckt [293-297]. In **Abb. 34** wurde ebenfalls eine sehr gute Anpassung ($P = 0,350$), dort an eine sigmoide Funktion nach Boltzmann, vorgenommen, obwohl eine transportlimitierte Adsorptionskinetik vorliegt. Eine gute Anpassung beseitigt aber nicht die Transportlimitierung. Die Transportlimitierung führt zu einem langsamen Anstieg der Oberflächenkonzentration, wodurch hochaffine Proteinkonformationen entstehen (**Abb. 67**). Die Messung des sehr schnell bindenden Nukleations-Komplexes ist mit der SPR nicht möglich, weil die Transportlimitierung die Messungen sehr stark verfälscht.

Ein weiterer gravierender Unterschied zwischen TIRF und SPR ist, daß bei der SPR die Adsorptionen, insbesondere bei Verwendung von niedrigen Proteinkonzentrationen nicht bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichtes durchgeführt werden [293,294,298]. Dadurch können die niederaffinen Nukleations-Komplexe nicht aufgefunden werden [299]. Der Unterschied zwischen SPR und TIRF soll am Beispiel der Bindung von Avidin an Biotin verdeutlicht werden, da für die Bindung von rhBMP-2 an Oberflächen, mit Ausnahme von [300], bisher keine Literaturdaten vorliegen.

In **Tab. 29** sind die Bindungskonstanten für die nichtkovalente Bindung von Avidin-FITC an immobilisiertem Biotin [237] und von Biotin an immobilisiertem Streptavidin [242] aufgeführt. Auffallend ist, daß die Bindungskonstanten, die mit der SPR-Spektroskopie ermittelt wurden, um den Faktor 20 kleiner sind als die Bindungskonstanten, die mit der TIRF-Spektroskopie erhalten wurden. Unter der Annahme, daß bei beiden Methoden keine Transportlimitierung vorhanden ist, sollte die Molekülgröße bei der Adsorption keine Rolle spielen. Dies trifft zum Beispiel auf die Adsorption von rhBMP-2 (25 kDa [59]), Fibrinogen (340 kDa [284]) oder Phosphorylase *b* (195 kDa [285]) an Quarzglas (TIRF) zu. Entsprechend sollte dies auch für die Moleküle Biotin (0,244 kDa [301]) und Streptavidin (67 kDa [302]) gelten. Mit der TIRF-Spektroskopie [237] wurden Adsorptionsgeschwindigkeitskonstanten gefunden, die um eine Zehnerpotenz größer sind als die mit der SPR [242] gefundenen, obwohl das Biotinmolekül

erheblich kleiner ist als das Avidin-FITC-Molekül. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, daß die Transportlimitierung bei der SPR, trotz Verwendung einer Luftblase, nicht beseitigt wurde. Die Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten sind bei der TIRF-Spektroskopie um eine Zehnerpotenz kleiner als bei der SPR.

Als weiterer Nachteil bei der SPR muß gegenüber der TIRF-Spektroskopie auch gelten, daß die Akzeptoren für das gelöste Protein nur schlecht an Gold adsorbieren [303], weshalb das auf dem Glas aufgedampfte Gold modifiziert [304-306] oder selbstassemblierende Monoschichten (SAM) aufgebracht werden müssen [307,308], an denen der Akzeptor gebunden wird. Meist bindet das gelöste Protein nicht spezifisch am Akzeptor, sondern auch an darunterliegende Dextran- oder SAM-Schichten, weshalb bei der SPR parallel eine Messung ohne Akzeptor durchgeführt und durch Differenzbildung beider Kinetiken die Adsorptionskinetik für die spezifische Adsorption ermittelt werden muß [309]. Die Bindung von Proteinen an Akzeptoren verläuft aber anders als an Dextran- oder SAM-Schichten. Dies kann dazu führen, daß an den Akzeptormolekülen andere Konformationen entstehen als an Dextran- oder SAM-Schichten [310]. Ein weiterer Vorteil der TIRF-Spektroskopie gegenüber der SPR ist, daß beliebige Anregungswellenlängen verwendet werden können. Überdies ist der Versuchsaufbau einfacher und bedarf nicht eines teuren Goniometers. Auch ist die Präparation der Meßzelle bei der TIRF-Methode erheblich günstiger und schneller, da weder Chrom als Träger für die Goldschicht, die Goldschicht selbst noch Polymere als Basisschicht zur Verankerung von Akzeptormolekülen aufgebracht werden müssen.

6 Zusammenfassung

Derzeit findet eine intensive Erforschung von Implantaten statt, die zur besseren Einheilung mit rekombinantem, humanem knochenmorphogenetischen Protein (rhBMP-2) beschichtet sind. Neben der Kenntnis der Sorptionsraten ist von großem Interesse, daß die auf den Implantaten aufgetragenen Stoffe in einer biologisch aktiven Konformation freigesetzt werden.

Primäres Ziel der Arbeit war die Ermittlung der kinetischen Konstanten (k_{+1} und k_{-1}) für die initiale Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas und an Poly-DL-laktid (PDLLA), um daraus die Bindungskonstanten abzuleiten. Ein weiteres Ziel lag im Erhalt von Informationen über Konformationsänderungen des rhBMP-2 auf diesen Oberflächen als Funktion der Verweildauer des Proteins auf der Oberfläche. Hierzu wurden Adsorptions- und Desorptionsmessungen an einem TIRF-Rheometer (TIRF: totale innere Reflexionsfluoreszenz) durchgeführt, bei der das Tryptophan bei 280 nm zur Fluoreszenz angeregt wird. Die geringe Eindringungstiefe erfaßt dabei nur die adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche und nicht diejenigen in der Bulklösung.

Die Transportlimitierung bei der Adsorption wurde beseitigt, indem die Proteinlösung mit einer vorangehenden Luftblase in die Meßzelle eingeleitet wurde. Die Luftblase reduziert die Nernstsche Diffusionsschicht um den Faktor 50 und führt zu exponentiellen Kinetiken, die eine mathematische Auswertung erlauben.

Es konnte gezeigt werden, daß Photobleaching nur bei Bestrahlungszeiten über 100 s die Fluoreszenz signifikant reduziert. Bei langandauernden Desorptionsexperimenten (bis 124 h) wurde daher der Einfluß des Photobleachings berücksichtigt, indem Korrekturfaktoren durch den Vergleich mit ^{125}I -markiertem rhBMP-2 ermittelt wurden. Die Fluoreszenz wurde weiterhin durch Fluoreszenzquenching reduziert. Dabei wurde erstmals ein paradoxes Verhalten des Quenchings festgestellt, nämlich eine *Abnahme* des Fluoreszenzquenchings mit zunehmender Oberflächenbeladung mit Protein. Vermutlich werden bei der initialen hochaffinen Bindung bei geringer Oberflächenbeladung die π -Systeme der endständigen Tryptophanpaare des Dimers so nah aneinander gebracht, daß durch einen strahlungslosen Energietransfer ein starker Fluoreszenzabfall erfolgt. Bei der darauffolgenden niederaffinen Bindung bei höherer Beladung, ist die Annäherung der Tryptophanpaare nur gering und verursacht einen entsprechend geringeren Fluoreszenzabfall. Nach Berücksichtigung der Quenchfaktoren konnten alle Adsorptionskinetiken an zweifach exponentielle Funktionen angepaßt werden.

Die zweifach exponentiellen Adsorptionskinetiken wurden nun für verschiedene Proteinkonzentrationen unter Bestimmung der Anstiege (k_{obs} -Werte) aufgenommen. Aus dem Auftrag der k_{obs} -Werte gegen die Proteinkonzentrationen wurden dann die kinetischen Konstanten (k_{+1} und k_{-1}) für den Initialkomplex bestimmt. Für die Adsorption von rhBMP-2 an Quarzglas ergaben sich zwei Geschwindigkeitskonstanten der Adsorption (k_{+1}) und der Desorption (k_{-1}), die auf zwei gleichzeitig ablaufende Bindungsreaktionen IA und IB auf Quarzglas hinwiesen. Daraus wurden die zwei Bindungskonstanten $K_{IA}' = 4,6 \pm 7,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und $K_{IB}' = 3,2 \pm 3,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ berechnet, die sich jedoch nicht signifikant voneinander unterscheiden. Diese Konstanten wurden durch ein unabhängiges Experiment mit ^{125}I -markiertem rhBMP-2 überprüft. Aus der Adsorptionsisotherme mit ^{125}I -rhBMP-2 konnte nur die Bindungskonstante $K_I' = 2,9 \pm 0,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ermittelt werden, die jedoch eine gute Übereinstimmung mit beiden Bindungskonstanten zeigt. Für die Adsorption von rhBMP-2 an PDLLA wurde aus der Auftragung die Bindungskonstante $K_I' = 3,9 \pm 2,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Da die Streuungen der Konstanten der Nukleations-Komplexe sehr groß sind, ist die gefundene Größenordnung entscheidend.

Zur Untersuchung des Einflusses der Verweildauer des Proteins auf der Oberfläche, wurden Desorptionsexperimente durchgeführt. In diesen Experimenten konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß sich das Protein auf der Oberfläche weiter konformationell verändert unter einer Erhöhung der Bindungskonstanten um bis zu 6 Größenordnungen auf $K_{IVA}' = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}$ (für die Bindung an Quarzglas) und $K_{IV}' = 9,5 \pm 1,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ (für die Bindung an PDLLA). Durch diese Untersuchungen konnte erstmals die Dynamik eines Proteins während der Adsorption auf einer Oberfläche in verschiedenen kinetischen Stufen erfaßt werden. Diese Stufen entsprechen metastabilen Zuständen in einer Protein-Adsorptions-Desorptions-Hysterese.

7 Literatur

- [1] S.-W. Ha, E. Wintermantel (2009) Einleitung in: *Medizintechnik – Life Science Engineering - Implantate*, 5. Aufl. (Hrsg. E. Wintermantel, S.-W. Ha), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 63.
- [2] J. R. Davis (2003) Overview of Biomaterials and Their Use in Medical Devices, in: *Handbook of materials for medical devices* (ed. J. R. Davis) ASM International, 1-5.
- [3] Andrade, J. D. (1985) Principles of Protein Adsorption, in: *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers* (J. D. Andrade, Ed.) Vol. 2, Plenum Press, New York, 1-80.
- [4] H. P. Jennissen (1988) General aspects of protein adsorption, *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*, **17**, 111-134.
- [5] V. Hlady, J. Buijs, H. P. Jennissen (1999) Methods for Studying Protein Adsorption, *Methods Enzym.*, **309**, 402-429.
- [6] H. P. Jennissen (2002) Accelerated and Improved Osteointegration of Implants Biocoated with Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **961**, 140-142.
- [7] H. P. Jennissen (2000) Verträglichkeit groß geschrieben; Neue Wege zur Bioverträglichkeit von Materialien durch gezielte Oberflächenmodifikation, in: „*Essener Unikate*“, Bd. 13, Wissenschaftsverlag Universität Essen, 78-93.
- [8] J. C. Rivière, S. Myhra (2009) *Handbook of Surface and Interface Analysis: Methods for Problem-Solving*, 2nd Ed., CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton (FL), 550-551.
- [9] O. Svensson, J. Sotres, A. Barrantes (2013) Investigating Protein Interactions at Solid Surfaces-In situ, Non-Labeling Techniques, in: *Proteins in Solution and at Interfaces, Methods and Applications in Biotechnology and Material Science* (J. M. Ruso, Á. Piñeiro, Eds.) John Wiley & Sons, Inc., 113-138.
- [10] G. Sauerbrey (1959) Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Z. Phys.*, **155** (2), 206-222.
- [11] P. A. Cuypers, W. T. Hermens, H. C. Hemker (1978) Ellipsometry as a tool to study protein films at liquid-solid interfaces, *Analytical Biochemistry*, **84** (1), 56-67.
- [12] U. Jönsson, M. Malmqvist, I. Ronnberg (1985) Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques, *Journal of Colloid and Interface Science*, **103** (2), 360-372.
- [13] J. W. Corsel, G. M. Willems, J. M. M. Kop, P. A. Cuypers, W. T. Hermens (1986) The Role of Intrinsic Binding Rate and Transport Rate in the Adsorption of Prothrombin, Albumin, and Fibrinogen to Phospholipid Bilayers, *J. Colloid Interface Sci.*, **111**, 544-554.
- [14] J. Fahrenfort (1961) Attenuated total reflection A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds, *Spectrochimica Acta*, **17**, 698-709.
- [15] A. Otto (1968) Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik*, **216**, Issue 4, 398-410.
- [16] E. Kretschmann, H. Raether (1968) Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light, *Zeitschrift für Naturforschung*, **23a**, 2135–2136.

- [17] V. V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah (1997) SPR Studies of the Nonspecific Adsorption Kinetics of Human IgG and BSA on Gold Surfaces Modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs), *J. Colloid Interface Sci.*, **185** (1), 94-103.
- [18] D. G. Myszka, T. A. Mortona, M. L. Doile, I. M. Chaiken (1997) Kinetic analysis of a protein antigen-antibody interaction limited by mass transport on an optical biosensor, *Biophys. Chem.*, **64**, 127-137.
- [19] D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, T. A. Morton, B. Goldstein (1998) Extending the Range of Rate Constants Available from BIOCORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data, *Biophysical Journal*, **75**, 583-594.
- [20] V. Hlady, R. A. Van Wagenen, J. D. Andrade (1985) Total Internal Reflection Intrinsic Fluorescence (TIRF) Spectroscopy Applied to Protein Adsorption, in: *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers* (J. D. Andrade, Ed.) Vol. 2, Plenum Press, New York, 81-119.
- [21] A. Sanders, H. P. Jennissen (1996) Monitoring fibrinogen adsorption kinetics by interfacial TIRF-rheometry, *J. Mol. Recognit*, **9**, 503-508.
- [22] H. P. Jennissen, T. Zumbrik (2004) A novel nanolayer biosensor principle, *Biosens. and Bioelectron.*, **19**, 987-997.
- [23] M. Bieri, T. Bürgi (2006) Adsorption kinetics of L-glutathione on gold and structural changes during self-assembly: an in situ ATR-IR and QCM study, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 513-520.
- [24] G. Anand, S. Sharma, A. K. Dutta, S. K. Kumar, G. Belfort (2010) Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity, *Langmuir*, **26** (13), 10803-10811.
- [25] M. Dargahi, S. Omanovic (2014) A Comparative PM-IRRAS And Ellipsometry Study Of The Adsorptive Behaviour Of Bovine Serum Albumin On A Gold Surface, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, in press.
- [26] P. Silva-Bermudez, S. Muhl, S. E. Rodil (2013) A comparative study of fibrinogen adsorption onto metal oxide thin films, *Appl. Surf. Sci.*, **282**, 351-362.
- [27] H. M. Laborde, A. M. N. Lima, F. C. C. L. Loureiro, C. Thirstrup, H. Neff (2013) Adsorption, kinetics and biochemical interaction of biotin at the gold-water interface, *Thin Solid Films*, **540**, 221-226.
- [28] A. Gaspar, F. A. Gomez (2013) Application of surface plasmon resonance spectroscopy for adsorption studies of different types of components on poly(dimethylsiloxane), *Analytica Chimica Acta*, **777**, 72-77.
- [29] C. Pinholt, S. J. Kapp, J. T. Bukrinsky, S. Hostrup, S. Frøkjaer, W. Norde, L. Jorgensen (2013) Influence of acylation on the adsorption of GLP-2 to hydrophobic surfaces, *Int. J. of Pharmaceutics*, **440** (1), 63-71.
- [30] T. A. Morton, D. G. Myszka (1998) Kinetic analysis of macromolecular interaction using surface plasmon resonance biosensors, *Methods Enzymol.*, **295**, 268-294.
- [31] Y.-S. Lin, V. Hlady (1994) Human serum albumin adsorption onto octadecyl-dimethylsilylsilica gradient surface, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **2**, 481-491.
- [32] H. P. Jennissen, G. Botzet (1979) Protein binding to two-dimensional binding-site lattices: adsorption hysteresis on immobilized butyl-residues, *Int. J. Biol. Macromol.*, **1**, 171-179.
- [33] H. P. Jennissen (1986) Protein Binding to Two-Dimensional Hydrophobic Binding-Site Lattices: Sorption Kinetics of Phosphorylase *b* on Immobilized Butyl Residues, *J. Colloid Interface Sci.*, **111**, 570-586.

- [34] W. Nernst (1904) Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen, *Z. Phys. Chem.*, **47**, 52-55.
- [35] S. Horstmeier (2008) Aufbau eines Oberflächenplasmonresonanz-Biosensors, *Diplomarbeit*, Universität Bielefeld, Bielefeld, 48-51.
- [36] T. Gervais, K. F. Jensen (2005) Mass transport and surface reactions in microfluidic systems, *Chemical Engineering Science*, **61**, 1102-1121.
- [37] L. L. H. Christensen (1997) Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation, *Anal. Biochem.*, **249**, 153-164.
- [38] E. Mauriz, A. Calle, A. Abad, A. Montoya, A. Hildebrandt, L. Barceló, Lechuga, (2006) Determination of carbaryl in natural water samples by a surface Plasmon resonance flow-through immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics.*, **21**, 2129-2236.
- [39] J. Štěpánek, H. Vaisocherová, M. Piliarik (2006) Molecular Interactions in SPR Sensors, in: *Surface Plasmon Resonance Based Sensors* (J. Homola, Hrsg.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 69–91.
- [40] T. Zumbrink, T. (1999) Einfluß dünner Flüssigkeitsschichten auf die Sorptionskinetiken von Rinderfibrinogen und Glykogenphosphorylase b an Quarzglasoberflächen, *Dissertation*, Universität Gesamthochschule Essen, Essen.
- [41] H. P. Jennissen, T. Zumbrink (1999) Flow-through shear analyzer for biologically active molecules in liquid layers on surfaces, PCT Patent Application WO9961896A1, Prioritätsdatum 25. Mai 1998.
- [42] H. P. Jennissen (2005) Boundary-layer exchange by bubble: A novel method for generating transient nanofluidic layers, *Physics of Fluids*, **17**, 100616-1-9.
- [43] R. L. Rich, D. G. Myszkowski (2001) BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis, *J. Mol. Recognit.*, **14**, 223-228.
- [44] T. P. Burghardt, D. Axelrod (1981) Total internal reflection/fluorescence Photobleaching recovery study of serum albumin adsorption dynamics, *Biophys. J.*, **33**, 455-468.
- [45] H. Rubens, R. W. Wood (1911) Focal Isolation of Long Heat-Waves, *Phil. Mag.*, **21**, 249-261.
- [46] N. Mani (1974) Johann Florian Heller und die frühe klinische Chemie in der Mitte des 19. Jahrhunderts, in: *Wien und die Weltmedizin*, (E. Lesky, Hrsg.) Hermann Böhlaus Nachf. Gesellschaft m. b. H., Graz, 171.
- [47] J. J. Berzelius (1840) *Jahresbericht ü. d. Fortschr. d. phys. Wiss.*, **19**, 642.
- [48] J. Buddrus, B. Schmidt (2011) *Grundlagen der Organischen Chemie*, 4. Aufl., Verlag Walter de Gruyter GmbH und Co. KG, Berlin, New York, 835.
- [49] K. U. Linderstrøm-Lang (1952): Proteins and Enzymes, in: *Lane Medical Lectures*, Bd. 6, 1–115.
- [50] C. B. Anfinsen, R. R. Redfield, L. C. Choate, J. Page, W. R. Carroll (1954) Studies on the Gross Structure, Cross-Linkages, and the Terminal Sequences in Ribonuclease, *Journal of Biological Chemistry*, **207** (1), 201- 210.
- [51] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier (2010) *Makromolekulare Chemie*, 4. überarbeitete und erweiterte Aufl., Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 4-11.
- [52] H. L. Granzier, S. Labeit (2004) A Major Player in Myocardial Mechanics, Signaling, and Disease, *Circulation Research.*, **94**, 284-295.

- [53] A. M. Raem, R. W. Braun, H. Fenger, W. Michaelis, S. Nikol, S. F. Winter (2001) *Genmedizin: Eine Bestandsaufnahme*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 364-370.
- [54] D. P. Clark, N. J. Pazdernik (2009) *Molekulare Biotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 296.
- [55] M. R. Urist (1965) Bone: Formation by Autoinduction, *Science*, **150**, 893-899.
- [56] Moss, M., L. (1960) *Calcification in Biological Systems* (Hrsg. R. F. Sognnaes), Washington, DC, 323-328.
- [57] P. Goldhaber (1961) Osteogenic induction across millipore filters in vivo, *Science*, **133**, 2065-2067.
- [58] L. Saxen, S. Toivonen (1962) *Primary Embryonic Induction*, Logos Press, London, 271-300.
- [59] J. M. Wozney, V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, R. M. Hewick, E. A. Wang (1988) Novel Regulators of Bone Formation: Molecular Clones and Activites, *Science*, **242**, 1528-1534.
- [60] A. H. Reddi (1995) Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. Maureen Owen Revisited, *Clin. Orthop.*, **313**, 115-119.
- [61] P. ten Dijke, J. Fu, P. Schaap, B. A. Roelen (2003) Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **85-A**, Suppl. 3, 34-38.
- [62] M. Laub, H. P. Jennissen (2003) Identification of the anthelix motif in the TGF- β superfamily by molecular 3D-Rapid Prototyping, *Materialwiss. u. Werkstofftech.*, **34** (12), 1113-1119.
- [63] R. W. Padgett, J. M. Wozney, W. M. Gelbart (1993) Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2905-2909.
- [64] T. K. Sampath, K. E. Rashka, J. S. Doctor, R. F. Tucker, F. M. Hoffmann (1993) *Drosophila* transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 6004-6008.
- [65] S. D. Cook, J. E. Dalton, E. H. Tan, T. S. Whitecloud III, D. C. Rueger (1994) In Vivo Evaluation of Recombinant Human Osteogenic Protein (rhOP-1) Implants as a Bone Graft Substitute for Spinal Fusions, *Spine*, **19**, 1655-1663.
- [66] S. D. Cook, M. M. Wolfe, S. L. Salkeld, D. C. Rueger (1995) Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Segmental Defects in Non-Human Primates, *J. Bone Joint Surg. Am.*, **77** (A), 734-750.
- [67] M. R. Urist, Y. K. Huo, A. G. Brownell, W. M. Hohl, J. Buyske, A. Lietze, P. Tempst, M. Hunkapiller, R. J. DeLange (1984) Purification of bovine bone morphogenetic proteins by hydroxyapatite chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 371-375.
- [68] P. V. Hauschka, A. E. Mavrakos, M. D. Iafrafi, S. E. Doleman, M. Klagsbrun (1986) Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on Heparin-Sepharose, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12665-12674.
- [69] T. K. Sampath, N. Muthukumaran, A. H. Reddi (1987) Isolation of osteogenin, an extracellular matrix associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7109-7113.

- [70] E. A. Wang, V. Rosen, P. Cordes, R. M. Hewick, M. J. Kriz, D. P. Luxenberg, B. S. Sibley, J. M. Wozney (1988) Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9484-9488.
- [71] P. Ducy, G. Karsenty (2000) The family of morphogenetic proteins, *Kidney Int.*, **57**, 2207-2214.
- [72] W. Balemans, W. van Hul (2002) Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators, *Dev. Biol.*, **250**, 231-250.
- [73] T. Katagiri, A. Yamaguchi, M. Komaki, E. Abe, N. Takahashi, T. Ikeda, V. Rosen, J. M. Wozney, A. Fujisawa-Sehara, T. Suda (1994) Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage, *J. Cell Biol.*, **127**, 1755-1766.
- [74] B. L. Hogan (1996) Bone morphogenetic proteins in development, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 432-438.
- [75] T. Katzorke (2008) AMH – ein neuer ovarieller Marker mit zunehmender klinischer Bedeutung, *Frauenarzt*, **49**, 406-408.
- [76] K. Kosaki, M. T. Bassi, R. Kosaki, M. Lewin, J. Belmont, G. Schauer, B. Casey (1999) Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development, *Am. J. Hum. Genet.*, **64** (3), 712-721.
- [77] E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D. I. Israel, R. M. Hewick, K. M. Kerns, P. LaPan, P. (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2220-2224.
- [78] Y. Maruoka, S. Oida, T. Iimura, K. Takeda, I. Asahina, S. Enomoto, S. Sasaki (1995) Production of functional human bone morphogenetic protein-2 using a baculovirus/Sf-9 insect cell system, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **35**, 957-963.
- [79] R. Ruppert, E. Hoffmann, W. Sebald (1996) Human Bone Morphogenetic Protein 2 Contains a Heparin-Binding Site which Modifies its Biological Activity, *Eur. J. Biochem.*, **237**, 295-302.
- [80] H. P. Jennissen, T. Zumbink, M. Chatzinikolaidou, J. Steppuhn (1999) Biocoating of Implants with Mediator Molecules: Surface Enhancement of Metals by Treatment with Chromosulfuric Acid, *Materialwiss. Werkstofftech.* **30**, 838-845.
- [81] H. Cheng, W. Jiang, F. M. Phillips, R. C. Haydon, Y. Peng, L. Zhou, H. H. Luu, N. An, B. Breyer, P. Vanichkarn, J. P. Szatkowski, J. Y. Park, T. C. He (2003) Osteogenetic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs), *J. Bone Joint. Surg. Am.*, **85-A**, 1544-1522.
- [82] Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C. (1994) Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 Induces Healing in a Canine Long-Bone Segmental Defect Model. *Clin. Orthop.*, **301**, 302-312.
- [83] S. D. Cook, G. C. Baffes, M. W. Wolfe, T. K. Sampath, D. C. Rueger, I. Whitecloud (1994) The Effect of Recombinant Human Osteogenetic Protein-1 on Healing of Large Segmental Bone Defects, *J. Bone Joint. Surg. Am.*, **76-A**, 827-838.
- [84] T. J. Sigurdsson, E. Fu, D. N. Tatakis, M. D. Rohrer, U. M. Wikesja (1997) Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration, *Clin. Oral. Implants res.*, **8**, 367-374.

- [85] P. J. Boyne, R. E. Marx, M. Nevins, G. Triplett, E. Lazaro, L. C. Lilly, M. Alder, P. Nummikoski (1997) A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge maxillary sinus floor augmentation, *Int. J. Periodontics restorative Dent.*, **17**, 11-25.
- [86] G. N. King, N. King, F. J. Hughes (1998) Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo, *J. Periodontal Res.*, **33**, 226-236.
- [87] E. Tsuruga, H. Takita, H. Itoh, Y. Wakisaka, Y. Kuboki (1997) pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis, *J. Biochem. (Tokyo)*, **121**, 317-324.
- [88] K. Zurlinden, M. Laub, H. P. Jennissen (2005) Chemical Functionalization of a Hydroxyapatite Based Bone Replacement Material for the Immobilization of Proteins, *Materialwiss. Werkstofftech.*, **36**, 820-827.
- [89] S. Oda, A. Kinoshita, T. Higuchi, T. Shizuya, I. Ishikawa (1997) Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *J. Med. Dent. Sci.*, **44**, 53-62.
- [90] P. Laffargue, H. F. Hildebrand, M. Raimate, P. Frayssinet, J. P. Amoureux, X. Marchandise (1999) Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects, *Bone*, **25** (Suppl.), S55-S58.
- [91] S. R. Winn, H. Uludağ, J. O. Hollinger (1999) Carrier systems for bone morphogenetic proteins, *Clin. Orthop.*, **367** (Suppl.), S95-S106.
- [92] L. Hong, Y. Tabata, M. Yamamoto, S. Miyamoto, K. Yamada, N. Hashimoto, Y. Ikada (1998) Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1001-1014.
- [93] P. Bulpitt, D. Aeschlimann (1999) New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res.*, **47**, 152-169.
- [94] F. Blanquaert, D. Barritault, J. Caruelle (1999) Effects of heparin-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 63-72.
- [95] M. Chatzinikolaïdou, M. Laub, H. Rumpf, H. P. Jennissen (2002) Biocoating of Electropolished and Ultra-Hydrophilic Titanium and Cobalt Chromium Molybdenum Alloy Surfaces with Proteins, *Materialwiss. Werkstofftech.*, **33**, 720-727.
- [96] T. K. Lichtinger, R. T. Müller, N. Schürmann, M. Wiemann, M. Chatzinikolaïdou, H. M. Rumpf, H. P. Jennissen (2001) Osseointegration of Titanium Implants by Addition of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 (rhBMP-2), *Materialwiss. Werkstofftech.*, **32**, 937-941.
- [97] S. E. Abbatiello, T. J. Porter (1997) Anion-mediated precipitation of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2) is dependent upon heparin binding N-terminal region, *Protein Science*, **6** (2), 99.
- [98] T. Förster, T. (1948) Fluoreszenz organischer Verbindungen, *Ann. Physik*, **437**, 55-75.
- [99] G. G. Stokes (1852) On the change of refrangibility of light, *Phil. Trans.* **142**, 463-562.
- [100] A. Jabłoński (1933) Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes, *Nature*, **131**, 839.
- [101] E. Sternberg, D. Dolphin (1996) Pyrrolic Photosensitizers, *Current Medicinal Chemistry*, **3**, 239-272.

- [102] J. R. Lakowicz (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 10-20.
- [103] M. Holtzhauer, (1996) *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 123-142.
- [104] R. Düsing (2002) *Multidimensionale Fluoreszenzspektroskopie in der Umweltanalytik*, Herbert Utz Verlag, 153.
- [105] J. R. Albani (2004) Structure and dynamics of macromolecules: Absorption and fluorescence studies, Verlag Elsevier B.V., Amsterdam, 99-140.
- [106] H. Edelhoch (1967) Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins, *Biochemistry*, **6**, 1948-1954.
- [107] A. Löwe (2000) *Gasphasendiagnostik in diamantabscheidenden Flammen*, Verlag BoD, Norderstedt, S. 30.
- [108] M. Chatzinikolaïdou (2004) Untersuchungen zur Immobilisierung und Freisetzung von rekombinatem humanen bone morphogenic Protein 2 (BMP-2) in biologisch aktiver Form auf metallischen Implantatoberflächen, *Dissertation*, Universität Essen, Essen.
- [109] P. S. Dittrich, P. Schwille (2001) Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation, *Appl. Phys. B*, **73**, 829-837.
- [110] C. Eggeling, A. Volkmer, C. A. M. Seidel (2005) Molecular photobleaching kinetics of Rhodamin 6G by one- and two-photon induced confocal fluorescence microscopy, *ChemPhysChem*, **6**, 791-804.
- [111] C. Eggeling et al. (1998) Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis, *Anal. Chem.*, **70**, 2651-2659.
- [112] W. P. Ambrose et al. (1999) Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature, *Chemical Review*, **99**, 2929-2956.
- [113] M. D. Barnes, C.-Y. Kung, W. B. Whitten, J. M. Ramsey, S. Arnold (1996) Optical Processes in Micro Cavities: Solvation Dynamics and Single Molecule Detection, in: *Optical Processes in Micro Cavities* (R. K. Chung, A. J. Campillo) Word Scientific Publishing, Co. Pte. Ltd., Singapore, 137.
- [114] J. White, E. Stelzer (1999) Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells, *Trends Cell Biol*, **9** (2), 61-65.
- [115] Lippincott-Schwartz J, tan-Bonnet N, Patterson GH. (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol*, **5**, Suppl., S. 7-14.
- [116] A. J. Ridley, J. R. Whiteside, T. J. McMillan, S. L. Allinson (2009) Cellular and sub-cellular responses to uva in relation to carcinogenesis. *International Journal of Radiation Biology*, **85** (3), 177-195.
- [117] J. Cadet, R. Treoule (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singulet oxygen and superoxide anion radicals, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 661.
- [118] J. Regensburger (2010) Spektroskopische Untersuchungen zur Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Biomolekülen, Bakterien und Zellen, *Dissertation*, Universität Regensburg, Regensburg, 8.

- [119] J. P. McCormick, T. Thomason (1978) Near-Ultraviolet Photooxidation of Tryptophan. Proof of Formation of Superoxide Ion, *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1), 312-313.
- [120] R. T. Dean, F. U. Shanlin, R. Stocker, M. J. Davies (1997) Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation, *J. Biochem.*, **324**, 1-18.
- [121] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, C. A. M. Seidel (1998) Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis, *Anal. Chem.*, **70**, 2651–2659.
- [122] T. Christ, F. Kulzer, P. Bordat, T. Basché (2001) Watching the Photo-Oxidation of a Single Aromatic Hydrocarbon Molecule, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 4192-4195.
- [123] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol'chenko, M. Orrit (2004) Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly(vinylalcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Level, *J. Phys. Chem.*, **108** (A), 1657–1665.
- [124] R. L. Fork, Z. Kaplan (1972) Increased Resistance to Photodegradation of Rhodamin 6G in Cooled Solid Matrices, *Appl. Phys. Lett.*, **20**, 472-474.
- [125] F. Cichos, J. Martin, C. Borczyskowski (2004) Emission intermittency in silicon nanocrystals, *Phys. Rev.* **70** (B), 115314.
- [126] I. Chung, M. G. Bawendi, (2004) Relationship between single quantum-dot intermittency and fluorescence intensity decays of collections of dots, *Phys. Rev.*, **70** (B), 165304.
- [127] B. C. Hess, I. G. Okhrimenko, R. C. Davis, B. C. Stevens, Q. A. Schulzke, K. C. Wright, C. D. Bass, C. D. Evans, S. L. Summers (2001) Surface Transformation and Photoinduced Recovery in CdSe Nanocrystals, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 3132–3135.
- [128] L. Stryer (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 819–846.
- [129] O. Stern, M. Volmer (1919) Über die Abklingzeit der Fluoreszenz, *Physikalische Zeitschr.*, **20**, S. 183-188.
- [130] E. Meister (2006) *Grundpraktikum Physikalische Chemie; Theorie und Experimente*, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 226-229.
- [131] B. Valeur (2001) *Molecular Fluorescence and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 72-123.
- [132] A. Gaigalas, L. Wang, K. Cole, E. Humphries (2004) Photodegradation of fluorescein in solutions containing n-propyl gallate. *J. Phys. Chem. A* **108**, **20**, 4378–4384.
- [133] A. P. Demchenko (2009) *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Science Business Media B. V., 154-156.
- [134] M. Hof, V. Fidler, R. Hutterer, R. (2005) Basics of Fluorescence Spectroscopy in Biosciences, in: *Fluorescence Spectroscopy in Biology: Advanced Methods and their Applications to Membranes, Proteins, DNA, and cells* (O. S. Wolfbeis, Ed.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 11-16.
- [135] R. I. MacDonald (1990) Characteristics of Self-quenching of the Fluorescence of Lipid-Conjugated Rhodamine in Membranes, *J. Biol. Chem.*, **265** (23), 13533-13539.
- [136] H. Wendt, C. Berger, A. Baici, R. M. Thomas, H. R. Bosshard (1995) Kinetics of folding of leucine zipper domains, *Biochemistry*, **34**, S. 4097-4107.
- [137] Zhuang, X., Ha, T., Kim, H. D., Centner, T., Labeit, S., Chu, S. (2000) Fluorescence quenching: a tool for single-molecule protein-folding study, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, S. 241–244.

- [138] E. Wilde (1838) *Geschichte der Optik, vom Ursprunge dieser Wissenschaft bis auf die gegenwärtige Zeit*, Erster Theil, Verlag bei Rücker und Püchler, Berlin, 215-271.
- [139] F. Otto (1834) *Die Gesammtliteratur Niederlands, oder Leben und Wirken der holländischen Schriftsteller seit dem dreizehnten Jahrhundert auf unsere Zeit*, für Deutsche bearbeitet, Verlag des bibliographischen Instituts, Hildburghausen, Amsterdam, Philadelphia, 410-412.
- [140] F. L. Pedrotti, L. S. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt (1996) *Optik - Eine Einführung*, Prentice Hall Verlag, Haar bei München, S. 68-73.
- [141] O. Wiener (1890) *Ann. der Phys.*, **40**, 203.
- [142] J. D. Jackson (2006) *Klassische Elektrodynamik*, 4. Aufl., Walter de Gruyter Verlag, 356-260.
- [143] F. Goos, L. Hänchen (1947) Ein neuer und fundamentaler Versuch zur Totalreflexion, *Ann. Physik*, **6** (1), 333-346.
- [144] N. J. Harrick (1963) Total Internal Reflection and Its Application to Surface Studies, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **101**, 928-959.
- [145] R. Galensa, U. Engelhardt, M. Bahadir, H. Böhm (1995) *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der HPLC*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 93.
- [146] A. Sanders (1996) Kinetische Untersuchungen zum Mechanismus der Adsorption von Rinderfibrinogen an nativem und modifiziertem Quarzglas, *Dissertation*, Universität Gesamthochschule Essen, Essen.
- [147] H. D. Baehr, K. Stephan (2004) *Wärme- und Stoffübertragung*, 4., Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1-448.
- [148] E. Fitzer, W. Fritz (1975) *Technische Chemie - Eine Einführung in die Reaktionstechnik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 183-197.
- [149] M. Baerns, H. Hofmann, A. Renken (1992) *Chemische Reaktionstechnik*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 271 -371.
- [150] V. G. Levich (1962) *Physicochemical Hydrodynamics*, 2nd Ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 57-60.
- [151] R. L. Daugherty, J. B. Franzini (1977) *Fluid Mechanics with Engineering Applications*, 7th Ed., McGraw-Hill, New York, S. 564-567.
- [152] A. M. Lévêque, M. (1928) Les lois de la transmission de chaleur par convection, *Ann. Mines.*, **13**, 201-299.
- [153] A. Fick (1855) Ueber Diffusion, *Pogg. Ann. Phys.*, **94**, 59-86.
- [154] A. Einstein (1905) Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Ann. Phys.*, **17**, 549-560.
- [155] B. K. Lok, Y. L. Cheng, C. R. Robertson (1983) *J. Colloid Interface Sci.*, **91**, 87-116.
- [156] H. P. Jennissen, A. Sanders, H. J. Schnittler, V. Hlady (1999) TIRF-Rheometer for Measuring Protein Adsorption under High Shear Rates: Constructional and Fluid Dynamic Aspects, *Materialwiss. u. Werkstofftech.*, **30**, 850-861.
- [157] M. E. Fewell, J. D. Hellums (1977) The Secondary Flow of Newtonian Fluids in Cone and Plate Viscosimeters, *Trans. Soc. Rheol.*, **21** (4), 535-565.
- [158] G. Habenicht (2009) *Kleben Grundlagen, Technologien, Anwendungen*, 6., aktualisierte Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 322-340.
- [159] H. P. Jennissen (1989) Proteinadsorption auf alkylsubstituierten Oberflächen, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **93**, 948-956.

- [160] Jennissen, H. P. (2005) Hydrophobic Interaction Chromatography, Harnessing Multivalent Protein-Surface Interactions for Purification Procedures, *Methods Mol. Biol.*, **305**, 81-99.
- [161] J. N. Israelachvili, R. Pashley (1982) The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance, *Nature*, **300**, 341-342.
- [162] H. P. Jennissen (2002) Hydrophobic (interaction) chromatography of proteins, *Biochromatography* (M. A. Vijayalakshmi, Ed.) Verlag Taylor and Francis, London, 47-71.
- [163] Israelachvili, J. N. (1985) *Intermolecular and surface forces with applications to colloidal and biological system*, Academic Press Inc. Ltd., London, 102-105, 207-208.
- [164] C. Schmuck, B. Engels, T. Schirmeister, R. Fink (2008) *Chemie für Mediziner*, Pearson Education Deutschland GmbH, München, 123-124.
- [165] W. J. Moore (1990) *Grundlagen der Physikalischen Chemie*, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin, 361, 599-601.
- [166] K. Landsteiner, R. Uhlirz, R. (1905) Ueber die Adsorption von Eiweisskörpern. I. Mitteilung, *Centr. Bakt. Orig.*, **40**, 265-270.
- [167] H. Starkenstein, W. Blitz. (1910) *Biochem. Z.*, **23**, 27-42.
- [168] L. Vroman, A. L. Adams (1969) Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces, *J. Biomed. Mat. Res.*, **3**, 43-67.
- [169] H. P. Jennissen, A. Demiroglou, E. Logemann (1982) Studies on the mechanism of protein adsorption on hydrophobic agaroses, in: *Affinity Chromatography and Related Techniques*, Analytical Chemistry Symposia Series, Vol. 9, Elsevier, Amsterdam, 39-49.
- [170] A. Ewing (1881) On the production of transient electric currents in iron and steel conductors by twisting them when magnetised or by magnetising them when twisted, *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. A. **33**, 21-23.
- [171] E. Neumann (1973) Molekulare Hysterese und ihre kybernetische Bedeutung, *Angew. Chem.*, **85** (10), 430-444.
- [172] J. M. von Bemmelen (1897) Die Adsorption. Das Wasser in den Kolloiden, besonders in dem Gel der Kieselsäure, *Z. Anorg. Chem.*, **13**, 233-356.
- [173] D. H. Everett, D. H. (1967) Adsorption hysteresis, *Solid Gas Interface*, **2**, 1055-1113.
- [174] E. Neumann (1973) Molecular Hysteresis and its Cybernetic Significance, *Angew. Chemie., Int. Ed. Engl.*, **12**, 356-369.
- [175] H. P. Jennissen (1985) *Protein Adsorption Hysteresis* in: *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Vol. 2, Plenum Press, New York, 295-320.
- [176] R. Goedecke, R. (2006) *Fluid-Verfahrenstechnik*, Bd. 1, Verlag Wiley-VCH, Weinheim, 317.
- [177] I. Langmuir (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Amer. Chem. Soc.* **40**, 1361-1403.
- [178] W. Henry (1805) Über die Gasmengen, welche das Wasser nach Verschiedenheit der Temperatur und nach Verschiedenheit des Drucks absorbiert, *Ann. Phys.*, **20**, 147-167.
- [179] H. Freundlich (1907) Ueber die Adsorption in Loesung, *Z. Physikal. Chem.*, **57**, 385-470.
- [180] H. P. Jennissen (1976) Evidence for negative cooperativity in the adsorption of phosphorylase b on hydrophobic agaroses, *Biochemistry*, **15**, 5683-5692.

- [181] K. Görner, K. Hübner (1999) *Gasreinigung und Luftreinhaltung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. F47.
- [182] M. Temkin, V. Pyzhev (1940) Kinetics of ammonia synthesis on promoted iron catalysts, *Acta Physicochimica URSS*, **12**, 327-356.
- [183] R. D. Johnson, F. H. Arnold (1995) The Temkin isotherms describes heterogeneous protein adsorption, *Biochemica et Biophysica Acta.*, **1247**, 293-297.
- [184] D. O. Hayward, B. M. W. Trapnell (1964) *Chemisorption*, 2nd Ed., Verlag Butterworth, London, 1-323.
- [185] R. Sips (1984) Structure of a catalyst surface, *Journal of Chemical Physics*, **16**, 490-495.
- [186] O. Redlich, D. L. Peterson (1959) A useful adsorption isotherm, *J. Phys. Chem.*, **63**, 1024-1026.
- [187] H. P. Jennissen (1981) The Binding and Regulation of Biologically Activate Proteins on Cellular Interfaces: Model Studies of Enzyme Adsorption on Hydrophobic Binding Site Lattices and Biomembranes, *Adv. Enzyme. Regul.*, **19**, 377-406.
- [188] R. Karlsson, H. Roos, H. Faegerstam, P. Persson (1994) Kinetic and concentration analysis using BIA, technology, *Methods*, **6**, 100-110.
- [189] H. Gutfreund (1974) Equilibria and kinetics of protein-ligand interaction, in: *Chemistry of Macromolecules*, Vol.1, University Park Press, London, 261-286.
- [190] A. Sanders, H. P. Jennissen (1995) Monitoring Fibrinogen Adsorption Kinetics by Interfacial TIRF Rheometry, *J. Molecul. Rec.*, **9**, 503-508.
- [191] C. F. Bernasconi (1976) *Relaxation Kinetics*, Academic Press, New York, San Francisco, London (Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers), 3-18.
- [192] O. Reynolds (1883) An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels, Royal Soc. London, *Philos. Trans.*, **174**, 935-982.
- [193] L. Prandtl (1952) *Essentials of Fluid Dynamics*, Hafner Publications. Co, New York, 98-104.
- [194] H. Schlichting (1955) *Boundary Layer Theory*, McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, 146-148, 430-432.
- [195] L. Prandtl (1904) Über Flüssigkeitsbewegung bei sehr kleiner Reibung, *Verhandl. d. international. Mathematiker - Kongr. zu Heidelberg*, 484-491.
- [196] E. Riecke (1928) *Lehrbuch der Physik*, Band 1, Verlag de Gruyter, (E. Lecher, Hrsg.), Berlin, 215.
- [197] F. P. Bretherton (1961) The motion of long bubbles in tubes, *J. Fluid. Mech.*, **10**, 166-188.
- [198] K. Watanabe, Y. Udagawa, H. Udagawa (1999) Drag reduction of Newtonian fluid in a circular pipe with a highly water-repellent wall, *J. Fluid. Mech.*, **381**, 225.
- [199] E. Bonaccorso, M. Kappl, H.-J. Butt (2002) Hydrodynamic force measurements: Boundary slip of water on hydrophilic surfaces and electrokinetic effects, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 076103(1-4).
- [200] Y. Zhu, S. Granick (2002) Limits of the hydrodynamic no-slip boundary condition, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 106102(1-4).
- [201] T. Young, (1805) An Essay on the Cohesion of Fluids, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **95**, 75-87.

- [202] W. A. Zisman (1964) Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution, *Adv. Chem. Ser.*, **43**, 1-51.
- [203] H. P. Jennissen (2001) Ultra-hydrophile metallische Biomaterialien, *Biomaterialien* **2**, 45-53.
- [204] D. Li, A. W. Neumann (1992), *J. Colloid Interface Sci.*, **66**, 579-586.
- [205] A. S. Dimitrov, P. A. Kralchevsky, A. D. Nikolav, H. Noshoi, M. Matsumo (1991), *J. Colloid Interface Sci.*, **145**, 279-284.
- [206] D. K. Chattoraj, K. S. Birdi (1984) *Adsorption and the Gibbs Surface Excess*, Plenum Press, New York, London, 250.
- [207] J. D. Andrade, L. M. Smith, D. E. Gregonis (1985) The Contact Angle and Interface Energetics. *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers* (Andrade, J. D., Ed.) Vol. 1, Plenum Press, New York, London, 249-292.
- [208] K. Lunkenheimer, K. D. Wandtke (1978) *J. Colloid Interface Sci.*, **66** 579-584.
- [209] C. Huh, S. G. Mason (1975) A rigorous theorie of ring tensiometry, *Colloid and Polymer Sci.*, **253**, 566-580.
- [210] L. F. Wilhelmly (1863) *Pogg. Ann. Phys. Chem.*, **119**, 117-121.
- [211] R. E. Johnson, R. Dettre (1969) Wettability and Contact Angles, in: *Surface and Colloid Sci.*, Bd. 2, Wiley and Sons, New York, 85-153.
- [212] R. E. Baier (1972) The role of surface energy in thrombogenesis, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **48**, 257-272.
- [213] H. P. Jennissen, M. Chatzinikolaidou, H. M. Rumpf, T. Lichtinger, R. Müller (2000) Modification of Metall Surfaces and Biocoating of Implants with Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), *DVM-Bericht*, **313**, 127-140.
- [214] J. M. Schakenraad, H. J. Busscher, C. R. Wildevuur, J. Arends (1986) The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 773-784.
- [215] H. J. Schnittler, R. P. Franke, U. Akbay, C. Mrowietz, D. Drenckhahn (1993) Improved in vitro rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells, *Am. J. Physiol.*, **265**, 289-298.
- [216] W.-M. Kulicke, N. Böse (1986) in *Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen*, Hüthig und Wepf Verlag, Basel, Heidelberg, New York, 82-83.
- [217] S. Ban (2003) Effect of alkaline treatment of pur titanium and its alloys on the bonding strength of dental veneering resins, *J. Biomed. Mat.*, **66A**, Issue 1, 138-145.
- [218] T. Säger (2013) Herstellung biologisch aktiver rh-BMP-2-haltiger Poly-(D,L)-laktid-Komposite als osteoinduktive und resorbierbare Knochenersatzmaterialien, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, Essen.
- [219] H. P. Jennissen, S. Madenci, S. Lüers, M. Laub (2013) Monitoring Polyelectrolyte Multilayer Assembly and Stability on Non-Transparent Rough Metal Surfaces, *Biomed. Tech.*, **58** (Suppl. 1), 825-826.
- [220] S. Lüers, C. Seitz, M. Laub, H. P. Jennissen (2013) On the Utility of Imaginary Contact Angles in the Characterization of Wettability of Rough Medicinal Hydrophilic Titanium, in: *Advances in Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Vol. 1, (K. L. Mittal, Ed.), Scrivener Publishing Wiley, 155-172.
- [221] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951) Proteinmeasurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.

- [222] A. S. McFarlane (1963) In Vivo Behavior of I^{131} -Fibrinogen, *J. of Clinical Investigation*, **43** (3), 346-361.
- [223] K. R. Garrison, I. Shemil, S. Donell, J. J. Ryder, M. Mugford, I. Harvey, F. Song, V. Alt (2010) Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults (Review), Verlag, Wiley & Sons, Ltd., 1-155.
- [224] L. T. Zhuravlev, V. V. Potapov (2006) Density of silanol groups on the surface of silica precipitated from a hydrothermal solution, *Russian Journal of Physical Chemistry*, **80** (7), 1272-1282.
- [225] G. Demirel, M. Çakmak, T. Çaykara, Ş. Ellialtıoğlu (2007) Chemisorption of Aminopropyltrimethoxysilane on Si(001)-(2x2), *J. Phys. Chem. C.*, **111**, 15020-15025.
- [226] E. A. Smith, W. Chen (2008) How to Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes, *Langmuir*, **23** (21), 12405-12409.
- [227] T. Bein, D. G. Kurth (1992) Quantifizierung der Reaktivität von 3-Aminopropyltriethoxysilan-Monoschichten mit der Quarzmikrowaage, *Angewandte Chemie*, **104** (3), 323-325.
- [228] G. Decher, B. Lehr, K. Lowack, Y. Lvov, J. Schmitt (1994) New nanocomposite films for biosensors: layer-by-layer adsorbed films of polyelectrolytes, proteins or DNA, *Biosensors and Bioelectronics*, **9**, 677-684.
- [229] S. Madenci, M. Laub, H. P. Jennissen (2010) Biological Activity of rhBMP-2 immobilized on Titanium Plasma Sprayed Surfaces, *BIOMaterialien*, **11** (S1), 61.
- [230] T. Sanger, M. Laub, H. P. Jennissen (2013) Release of ^{125}I -rhBMP-2 from Foamed Poly-(DL)-Lactide, *Biomed. Tech.*, **58**, S. 989-990.
- [231] L. Sachs (2004) *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, 11., überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 150.
- [232] R. Zellner (2013) Grund-Praktikum Physikalische Chemie Studiengänge B.Sc. und Water Science B.Sc. Version 3.4, Iniversitat, Duisburg-Essen, 6-8.
- [233] B. Valeur, M. N. Barberan-Santos (2012) Molecular Fluorescence. Principles and Applications, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 67.
- [234] M. Meißner (2007) Messung der Adsorption von Avidin an immobilisiertem Biotin mit Hilfe der Totalen-Inneren-Reflexions-Fluoreszenzspektroskopie nach Erzeugung einer Nanoschicht mit Hilfe einer Luftblase, *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, Essen.
- [235] N. J. De Mol, M. J. E. Fischer (2008) Kinetic and Thermodynamic Analysis of Ligand-Receptor Interactions: SPR Applications in Drug Development, in: *Handbook of Surface Plasmon Resonance* (R. B. M. Schasfoort and A. J. Tudos, Eds.) RSC Publishing, 123-135.
- [236] B. Ivarsson, M. Malmqvist (2004) Surface plasmon resonance: development and use of BIACORE instruments for biomolecular interaction analysis, in: *Biomolecular sensors* (E. Gizeli, C. R. Lowe, Hrsg.), Verlag Taylor & Francis e-Library, 255.
- [237] M. Meißner, H. P. Jennissen (2011) Analysis of Transient Affinity Changes in the Adsorption of Avidin-FITC on Immobilized Biotin by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), *BIOMaterialien*, **12** (1-4), 168.
- [238] C. L. M. H. Navier (1823) Mémoire sur les lois du mouvement des fluides, *Mem.Acad. Roy. Sci. Paris*, **6**, 389.
- [239] R. W. Wood (1902) On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, **4**, 396-402.

- [240] R. W. Wood (1912) Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity, *Philosophical Magazine*, **23**, 310-317.
- [241] Lord Rayleigh (1907) Dynamical theory of the grating, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **A79**, 399.
- [242] R. D'Agata, G. Grasso, G. Spoto. (2008) Real-Time Binding Kinetics Monitored with Surface Plasmon Resonance Imaging in a Diffusion-Free Environment, *The Open Spectroscopy Journal*, **2**, 1-9.
- [243] R. Chelmowski (2008) Proteinchemie an Oberflächen - von der spezifischen Interaktion bis zur Proteinresistenz, *Dissertation*, Universität Hamburg, Hamburg, 47-51.
- [244] I. D. Johnson (2006) Practical Considerations in the Selection and Application of Fluorescent Probes, in: *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (J. B. Pawley, Ed.) 3rd Ed., Springer Science + Business Media LLC, 353-367.
- [245] G. H. Melchior (1957) Über den Abbau von Indolderivaten. I. Mitteilung: Photolyse durch Ultraviolettes Licht, *Planta*, S. 262-290.
- [246] F. Sanger (1952) The Arrangement of Amino Acid in Proteins, *Adv. Protein Chem.*, **7**, 1-67.
- [247] D. E. Metzler, C. M. Metzler (2003) *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells Sec.*, 2nd, Vol. 2, Academic Press, San Diego, Burlington, London, 1297.
- [248] R. Plessow (2004) Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe von zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie, *Dissertation*, Universität Bielefeld, Bielefeld.
- [249] T. Christ, T. (2002) Einzelmolekülspektroskopie zwischen 1.4 K und Raumtemperatur - Untersuchungen zur elektronischen Wechselwirkung in multichromophoren Systemen sowie zur Photooxidation von Terrylen, *Dissertation*, Universität Mainz, Mainz.
- [250] J. B. A. Ross, A. G. Szabo, C. W. V. Hogue (1997) Enhancement of Protein Spectra with Tryptophan Analogs: Fluorescence Spectroscopy of Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions, *Methods in Enzymology*, **278**, 151-189.
- [251] C. Scheufler, W. Sebald, M. Hülsmeier (1999) Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å Resolution, *J. Mol. Biol.*, **287**, 103-115
- [252] J. R. Lakowicz, J. R. (2000) *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Vol. 6, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 6.
- [253] A. Finazzi-Agro, G. Rotilio, L. Avigliano, P. Guerrieri, V. Boffi, B. Mondovi (1970) Environment of copper in *pseudomonas fluorescens* azurin: Fluorimetric approach, *Biochemistry*, **9**, 2009-2014.
- [254] A. G. Szabo, T. M. Stepanik, D. M. Wagner, N. M. Young (1983) Conformational heterogeneity of the copper binding site in azurin, *Biophys. J.*, **41**, 233-244.
- [255] S. F. Scarlata (1996) The Effects of Increased Viscosity on the Function of Integral Membrane Proteins, in: *High-Pressure Effects in Molecular Biophysics and Enzymology* (J. L. Markley, D. B. Northrop, and C. A., Royer, Ed.) Oxford University Press, Inc., 331-345.
- [256] E. K. C. Lee, H. O. Denschlag, G. A. Haninger (1968) *J. Chem. Phys.*, **48**, 4547-4553.
- [257] T. W. Whaley, G. H. Daub, F. N. Hayes (1971) A stereochemical approach to self-Quenching studies in some bridged p-quarterphenyl systems, in: *In Organic Scintillators and Liquid Scintillation Counting* (D. L. Horrocks and Peng, C.-T., Eds.) Academic Press, Inc., New York, 425-430.

- [258] D.-S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, W. M. Nau (2011) Operational calixarene-based fluorescent sensing systems for choline and acetylcholine and their application to enzymatic reactions, *Chem. Sci.*, **2**, 1722-1734.
- [259] M. Andresen, A. C. Stiel, S. Trowitzsch, G. Weber, C. Eggeling, M. C. Wahl, S. W. Hell, S. Jacobs (2007) Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13005-13009.
- [260] D. Sinnecker, P. Voigt, N. Hellwig, M. Schaefer (2005) Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins, *Biochemistry*, **44**, 7085-7094.
- [261] N. Periasamy, S. Bicknese, A. S. Verkman (1996) Reversible photobleaching of fluorescein conjugates in air-saturated viscous solutions: singlet and triplet state quenching by tryptophan, *Photochemistry and Photobiology*, **63**, 265-271.
- [262] D. G. Castner, B. D. Ratner (2002) Biomedical surface science: Foundations to frontiers, *Surface Science*, **500**, 28-60.
- [263] B. Kasemo (2002) Biological surface science, *Surface Science*, **500**, 656-677.
- [264] M. Meißner (2010) Echtzeitkinetiken der Bindung von rhBMP-2 an Polyelektrolyt-Multilayer auf Quarzglas, *BIOMaterialien*, **11** (S1), 63.
- [265] J. Böing (2003) Modifizierung von Glas- und Titanoberflächen zur Verbesserung der Biokompatibilität, *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen, 18.
- [266] C. R. Jenney, M. M. DeFife, E. Colton, J. M. Anderson (1998) Human monocyte/macrophage adhesion, macrophage motility, and IL-4-induced foreign body giant cell formation on silane-modified surfaces in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 171-184.
- [267] F. Hölzl (2001) Entwicklung einer biodegradierbaren Harnleiterschleife - In-vitro Analytik von Poly(D,L-Lactid) als Homo- und Copolymer, Formgebungs-Technologie, Oberflächenmodifizierung und tierexperimentelle Untersuchung im Schaf-Modell, *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen, S. 43.
- [268] J. Piontek, R. Zdrenka, H. P. Jennissen (2010) Dependence of rhBMP-2 binding on the surface concentration of aminopropyl groups on glass, *BIOMaterialien*, **11** (S1), 71.
- [269] J. Buijs, V. Hlady (1997) Adsorption Kinetics, Conformation, and Mobility of the Growth Hormone and Lysozyme on Solid Surfaces, Studied with TIRF, *J. Colloid Interface Sci.*, **190** (1), 171-181.
- [270] J. D. Aptel, A. Carrooy, P. Dejardin, E. Pfefferkorn, P. Schaaf, A. Schmitt, R. Varoqui, J. C. Voegel, (1987) Adsorption and Desorption of Synthetic and Biological Macro-molecules at Solid-Liquid Interfaces, *ACS Symposium Series*, Chapter 15, **343**, 222-238.
- [271] N. M. Green (1975) Avidin, *Adv. Protein Chem.*, **29**, 85-133.
- [272] K. Zurlinden, M. Laub, E. Spassova, D. Moser, C. Schopper, G. Russmüller, R. Ewers, H. P. Jennissen (2010) Suitability of Bone replacement Materials as BMP-2 Delivery Devices, *Biomed. Tech.*, **55** (Suppl. 1), 28-30.
- [273] K. Zurlinden, M. Laub, H. P. Jennissen (2006) Immobilization of rhBMP-2 on bone replacement materials and controlled release, *BIOMaterialien*, **7** (3), 251.
- [274] D.-S. Dohle (2011) Zur Konformation des Fibrinogens bei der Adsorption auf Titanoberflächen, *Dissertation*, Universität Essen, Essen.
- [275] H. P. Jennissen (1979) Multivalent Adsorptions Mechanisms in Hydrophobic Chromatography, *J. Solid-Phase Biochem.*, **4**, 151-165.
- [276] W. Norde (2000) Proteins at *Physical Chemistry of Biological Surfaces*, (A. Baszkin, W. Norde, Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, 129.

- [277] A. Tronia, T. Dubrovski, S. Dubrovskaya, G. Radicchi, C. Nicolini (1996) *Langmuir*, **12**, 3272-3280.
- [278] Kondo, A., Mihar, J. (1996) *J. Colloid Interface Sci.*, **177**, S. 214-221.
- [279] Norde, W., Giacomelli, C. E. (1999) Conformational changes in proteins at interfaces: from solution to the interface, and back, *Macromolecular Chemistry and Physics – Macromolecular Symposia*, **145**, 125-136.
- [280] B. W. Morrissey (1977) The Adsorption and Conformation of Plasma Proteins: A Physical Approach, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **288**, 50-64.
- [281] O. von Brevern (1995) Experimentelle Untersuchungen zu Adsorption, Desorption, Konformation und Orientierung von Glykogenphosphorylas *b* an nativen und modifizierten Quarzglasoberflächen mittels der Totalen-Innenen-Reflexions-Fluoreszenzspektroskopie, *Dissertation, Dissertation*, Universität Gesamthochschule Essen, Essen.
- [282] S. Amitay-Shaprut, I. Freeman, S. Cohen (2010) *Methods in Bioengineering 3D Tissue Engineering*, Artech House (F. Berthiaume, J. Morgan, Eds), Norwood (MA), 103.
- [283] J. L. Wilson, I. M. Scott, L. L. McMurtry (2010) Optical Biosensing. Kinetics of Protein A-IGG Binding using Biolayer Interferometry, *Biochemistry and Biomolecular Biology Education*, **38** (6), 400-407.
- [284] C. E. Hall, H. S. Slayter (1959) The Fibrinogen Molecule: Its Size, Shape, and Mode of Polymerization, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5** (1), 11-16.
- [285] E. G. Krebs, D. S. Love, G. E. Bratvold, W. L. Trayser, W. L. Meyer, E. H. Fischer (1964) Purification and properties of rabbit muscle phosphorylase *b* kinase, *Biochemistry*, **3**, 1022-1033.
- [286] J. Homola, M. Piliarik (2009) Surface plasmon resonance (SPR) Sensors: approaching their limits?, *Optics Express*, **7** (19), 16505-16517.
- [287] S.-H. Wu, D. Núñez, S.-Y. Hu, M. P. Domingo, C.-Y. Chen, P.-K. Wei, J. Pardo, E. M. Gálvez, A. Chiou (2014) The effect of acidic pH on the inhibitory efficacy of peptides against the interaction ICAM-1/LFA-1 studied by surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, **56**, 159–166.
- [288] C. J. Huang, W. Knoll, A. Sessitsch, J. Dostalek (2014) SPR bacterial pathogen biosensor: The importance of fluidic conditions and probing depth, *Talanta*, **122**, 166-171.
- [289] V. K. Morya, M. Son, H.-B. Lee, E.-k. Kim (2014) Design and Optimization of SPR-Based Binding Assay for Evaluation and Screening of MITF–E-Box Binding Inhibitor, *Mol. Biotechnol.*, **56**, 265-273.
- [290] C. Bhan, T. L. Brower, D. Raghavan (2014) SPR studies of the adsorption of silver/bovine serum albumin nanoparticles (Ag/BSANPs) onto the model biological substrates, *Journal of Colloid and Interface Science*, **402**, 40–49.
- [291] S. Szunerits, N. Maalouli, E. Wijaya, J.-P. Vilcot, R. Boukherroub (2013) Recent advances in the development of graphene-based surface plasmon resonance (SPR) interfaces, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 1435-1443.
- [292] H. Zhang, D. Song, S. Gao, J. Zhang, H. Zhang, Y. Sun (2013) Novel SPR biosensors based on metal nanoparticles decorated with graphene for immunoassay, *Sensors and Actuators, B* **188**, 548-554.
- [293] E. Helmerhorst, D. J. Chandler, M. Nussio, C. D. Mamotte (2012) Real-time and Label-free Bio-sensing of Molecular Interactions by Surface Plasmon Resonance: A Laboratory Medicine Perspective, *Clin. Biochem. Rev.*, **33**, 161-173.

- [294] A. W. Drake, M. L. Tang, G. A. Papalia, G. Landes, M. Haak-Frendscho, S. L. Klakamp (2012) Biacore surface matrix effects on the binding kinetics and affinity of an antigen/antibody complex, *Anal. Biochem.*, **429**, 58-69.
- [295] R. L. Rich, D. G. Myszka (2001) BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis, *J. Mol. Recognit.*, **14**, 223-228.
- [296] D. G. Myszka, X. He, M. Dembo, T. A. Morton, B. Goldstein (1998) Extending the Range of Rate Constants Available from BIOCORE: Interpreting Mass Transport-Influenced Binding Data, *Biophysical Journal*, **75**, 583-594.
- [297] T. Moises (2008) Studien zum endosomalen Transport und der Signaltransduktion des Nervenwachstumsfaktors NGF unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen, *Dissertation*, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen Aachen, 71- 80.
- [298] H. Zhao, I. I. Gorshkova, G. L. Fu, P. Schuck (2013) A comparison of binding surfaces for SPR biosensing using an antibody-antigen system and affinity distribution analysis, *Methods*, **59**, 328-335.
- [299] Rabe, M., Verdes, D., Seeger, S. (2011) Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, **162** (1-2), 87-106.
- [300] M. Meißner, S. Madenci, H. P. Jennissen (2010) Real-time kinetics of the binding of rhBMP-2 to polyelectrolyte multilayers on quartz glass, *BIOmaterialien*, **11** (S1), 63.
- [301] G. G. Hammes (2007) *Chemistry for the biological sciences*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (NJ), 335.
- [302] J. Turková (1993) *bioaffinity chromatography*, 2nd, completely revised edition, Elsevier Science Publishers B.V., Amstardam, 96.
- [303] B. Johnson, S. Löfås, G. Lindquist (1991) Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors, *Anal. Biochem.*, **198**, 268-277.
- [304] H. Meyer, Biacore AP, Freiburg, Surface Plasmon Resonance - Biosensoren in der Proteomanalyse und der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung, *BIOspektrum*, Sonderausgabe, 8. Jahrgang (2006), 532-535.
- [305] A. Kausaite-Minkstiniene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte, A. Ramanavicius (2010) Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor, *Anal. Chem.*, **82**, 6401–6408.
- [306] S.-W. Kim, M.G. Kim, J. Kim, H.-S. Lee, H.-S. Ro (2007) Detection of the mycovirus OMSV in the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*, using an SPR biosensor chip, *J. Virol. Methods*, **148**, 120–124.
- [307] K. L. Prime, G. M. Whitesides (1991) Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces, *Science*, **252**, 1164-1167.
- [308] C. Pale-Grosdemagne (1991) *Journal of the American Chemical Society*, **113**, 12-22.
- [309] B. H. Schneider, E. L. Dickinson, M. D. Vach, J. V. Hoijer, L. V. Howard (2000) Highly sensitive optical chip immunoassays in human serum, *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 13-22.
- [310] P. M. Boltovets, V. R. Boyko, I. Y. Kostikov, N. S. Dyachenko, B. A. Snopok, Y. M. Shirshov (2002) Simple method for plant virus detection: effect of antibody immobilization technique, *J. Virol. Methods*, **105**, 141–146.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

8.1.1 Allgemeine Abkürzungen

A	Anregung.....	7
AMH	Anti-Müller-Hormon.....	5
APS	3-(Aminopropyl)-triethoxysilan.....	54
ATR	Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy.....	1
BLEB	Boundary Layer Exchange by Bubble.....	28
BMP	Bone Morphogenetic Protein.....	4
C3H10T1/2	pluripotente mesenchymale Vorläuferzelle.....	6
CDMP	Cartilage-Derived Morphogenetic Proteins.....	4
cps	counts per seconds.....	70
CSS	Chromschwefelsäure.....	54
DNA	Desoxyribonucleic Acid.....	3
DPP	Decapentaplegic.....	4
F	Fluoreszenz, Fluorophor.....	7,10
FITC	Fluorescein Isothiocyanat.....	140
FQ	nichtfluoreszierender Komplex zwischen Fluorophor und Quencher.....	10
FRAP	Fluorescence Recovery After Photo Bleaching.....	10
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer.....	10
GBB	Glass Bottom Boat.....	4
GDF	Growth and Differentiation Factors.....	4
Gl.	Gleichung.....	11
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure.....	53
<i>IEP</i>	Isoelektrischer Punkt.....	6
IC	Internal Conversion.....	7
¹²⁵ I	(Iodisotop 125).....	59
ISC	Intersystem Crossing.....	7
kDa	Kilodalton.....	6
KOH	Kaliumhydroxid.....	54
LEFTY	Left-Right Determination Factors.....	5
NaAc	Natriumacetatpuffer.....	53
NaOH	Natriumhydroxid.....	53

OP	Osteogenic Proteins.....	4
P	Phosphoreszenz.....	7
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung.....	53
PDLLA	Poly-DL-Laktid.....	55
PGA	Natriumpolyglutamat.....	55
<i>pH</i>	potentia Hydrogenii.....	8
phBMP-2	Purified Human Bone Morphogenetic Protein.....	5
PLL	Poly-L-lysin Hydrobromid.....	55
Q	Quencher.....	10
QCM	Quartz Crystal Mikrobalance.....	1
rhBMP-2	Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein.....	2
ROS	reaktive Sauerstoffspezies.....	10
S_0	Singulettgrundzustand.....	7
S_1	erster angeregter Singulettzustand.....	7
S_2	zweiter angeregter Singulettzustand.....	7
SDS	Natriumdodecylsulfatlösung	53
SPR	Surface Plasmon Resonance Spektroskopie.....	1
Trp	Tryptophan.....	145
T_1	erster Triplettzustand.....	7
T_2	zweiter Triplettzustand.....	7
TGF	Transforming Grows Factor.....	4
THS	Trichlorhexylsilan.....	54
TIRF	Totale innere Reflexionsfluoreszenz Spektroskopie.....	1
UV	Ultraviolettes Licht.....	2
VE	vollentsalzt.....	48
VR	strahlungslose Übergänge.....	7

8.1.2 Formelzeichen

a	Anteil der gesamten Strahlung, die bei λ_{em} gemessen wird.....	16
a	Sorptionskonstante nach Freundlich.....	33
b	Dicke einer rechtwinkligen Durchflußzelle.....	25
$b \int_0^\infty (E_\perp^e)^2 dz$	Produkt aus Lichtintensität und Zellendicke.....	16
c	Konzentration (allgemein).....	16
c_0	Konzentration in der Bulkphase bzw. Lösung.....	26
c_b	Konzentration in der Bulkphase bzw. Lösung.....	36

c_P	Proteinkonzentration in der Bulkphase bzw. Lösung.....	17
c_S	Konzentration des Standards.....	113
Ca	Kapillarzahl.....	41
d	Dicke der Meßzelle.....	16
d_P	Eindringungstiefe der evaneszenten Welle.....	14
D	Diffusionskoeffizient.....	24
E_{\perp}^e	elektrische Feldamplitude des senkrecht polarisierten evaneszenten Feldes..	15
E_{\perp}^t	elektrischer Feldvektor der senkrecht polarisierten elektromagnetischen Welle.....	15
E_P	Extinktion der Proteinlösung.....	22
E_S	Extinktion der Standardlösung.....	22
$E_{y(0)}^t$	elektrischer Feldvektor der senkrecht polarisierten elektromagnetischen Welle in Richtung in Richtung $y(0)$	15
f_{21}^{124}	Umrechnungsfaktor von Belichtungsrate 124 s/h auf 21 s/h.....	105
f_0^{21}	Umrechnungsfaktor von Belichtungsrate 21 s/h auf 0 s/h.....	108
f_B	Bleachkonstante.....	94
f_B^*	Bleachkonstante.....	147
f_F	Umrechnungsfaktor.....	57
f_I	inkubationsdauerabhängiger Umrechnungsfaktor	132
f_K	Korrekturfaktor.....	22
$f(\lambda_{em})$	Anteil der gesamten Strahlung, die bei λ_{em} emittiert wird.....	16
F	Kraft (allgemein).....	46
F_A	Auftriebskraft.....	46
F_B	Benetzungskraft.....	46
F_G	Gewichtskraft.....	46
$[F]$	Konzentration des Fluorophors.....	11
$[F]_0$	Konzentration des Fluorophors vor Bildung des Fluorophor-Quencher-Komplexes.....	11
$[FQ]$	Konzentration des Fluorophor-Quencher-Komplexes.....	11
g	mittlere Erdbeschleunigung.....	46
h	Dicke des Flüssigkeitsfilms.....	41
k	Sorptionsgeschwindigkeitskonstante (allgemein).....	66
k_{+1}	interaktionsfreie Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	36
k_{-1}	interaktionsfreie Desorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	36
$k_{+1}^{\circ}, k_{+2}^{\circ}, \dots$	Geschwindigkeitskonstanten für Konformationsumwandlung (Hinreaktion).....	29
$k_{-1}^{\circ}, k_{-2}^{\circ}, \dots$	Geschwindigkeitskonstanten für Konformationsumwandlung (Rückreaktion).....	29

k_{-2}, k_{-3}, \dots	Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten aus Desorptionsexperimenten.....	68
$k_{-2}^{\#}$	Mittelwert der Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten k_{-2}^{α} und k_{-2}^{β}	132
$k_{-2}^{\alpha}, k_{-3}^{\alpha}, \dots$	Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten bei einer Belichtungsrate von 21 s/h und nach einer Inkubationsdauer von 19 h.....	101
$k_{-2}^{\beta}, k_{-3}^{\beta}, \dots$	Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten bei einer Belichtungsrate von 21 s/h und nach einer Inkubationsdauer von 500 s.....	104
$k_{-2}^{\gamma}, k_{-3}^{\gamma}, \dots$	Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten bei einer Belichtungsrate von 124 s/h und nach einer Inkubationsdauer von 500 s.....	104
k_{-1}^p und k_{-2}^p	Photobleachgeschwindigkeitskonstanten.....	92
k_{+1A}	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante der Konformation IA.....	126
k_{-1A}	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante der Konformation IA.....	126
k_{+1B}	Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante der Konformation IB.....	126
k_{-1B}	Desorptionsgeschwindigkeitskonstante der Konformation IB.....	126
k_{obs}	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	38
k_{obs}^{app}	apparente konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	81
k_{obs}^o	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante ohne Photobleaching.....	93
k_{obs}^m	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante mit Photobleaching.....	93
k_{obs}^*	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante aus sigmoider Anpassung.....	82
$k_{obs,A}$	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante für den Kinetikanteil der schnell verlaufenden Adsorption.....	68
$k_{obs,B}$	konzentrationsabhängige Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante für den Kinetikanteil der langsam verlaufenden Adsorption.....	68
k_{off}	intrinsische Desorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	36
k_{on}	intrinsische Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	36
k_{off}^{app}	apparente Desorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	37
k_{on}^{app}	apparente Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante.....	37
k_{tr}	Massentransportgeschwindigkeitskonstante.....	40
$^e k$	extrapolierte Desorptionsgeschwindigkeitskonstanten.....	155
K_I'	Bindungskonstante Konformation I.....	121
K_{IA}'	Bindungskonstante Konformation IA.....	126
K_{IB}'	Bindungskonstante Konformation IB.....	126
K_{IIA}'	Bindungskonstante Konformation IIA.....	153
$K_{IIA}^{\#}$	Bindungskonstante Konformation IIA berechnet mit $k_{-2}^{\#}$	153

K_{IIB}'	Bindungskonstante Konformation IIB.....	153
$K_{IIB}^{\#}$	Bindungskonstante Konformation IIB berechnet mit $k_{-2}^{\#}$	153
K_{IIIA}^*	Bindungskonstante Konformation IIIA mit Berücksichtigung von Q	153
K_{IIIB}^*	Bindungskonstante Konformation IIIB mit Berücksichtigung von Q	153
K_{IIIA}^{β}	Bindungskonstante Konformation IIIA.....	153
K_{IIIB}^{β}	Bindungskonstante Konformation IIIB.....	153
K_{IVA}'	Bindungskonstante Konformation IVA.....	153
K_{IVB}'	Bindungskonstante Konformation IVB.....	153
K_A'	Bindungskonstante.....	30
$K_{A,A}'$	Bindungskonstante für die schneller adsorbierende Konformation.....	69
$K_{A,B}'$	Bindungskonstante für die langsamer adsorbierende Konformation...	69
K_D'	Dissoziationskonstante, Halbsättigungskonstante.....	30, 68
$K_{D,A}'$	Halbsättigungskonstante für die schneller adsorbierende Konformation.....	69
$K_{D,B}'$	Halbsättigungskonstante für die langsamer adsorbierende Konformation...	69
${}^e K'$	extrapolierte Bindungskonstante Konformation IVB.....	155
K_H	Henry-Konstante.....	32
K_{H_1}	Hill-Konstante für die Gitterstellenbindungsfunktion.....	35
K_{H_2}	Hill-Konstante für die Ligandenbindungsfunktion.....	35
K_L	Gleichgewichtskonstante nach Langmuir.....	31
K_{SV}^{dyn}	Stern-Volmer-Konstante für dynamisches Fluoreszenzquenching.....	11
K_{SV}^{st}	Stern-Volmer-Konstante für statisches Fluoreszenzquenching.....	10
l	Länge einer rechtwinkligen Durchflußzelle.....	26
l	Strecke zwischen Einspülor und Mitte bei einer rechtwinkligen Durchflußzelle.....	26
m	Masse (allgemein).....	47
m_K	Masse des Körpers.....	46
m_l	Masse der den Körper benetzenden Flüssigkeit.....	46
M	molare Masse.....	75
n	Stoffmenge (allgemein).....	26
n_1	Brechungsindex des optisch dichteren Mediums.....	13
n_2	Brechungsindex des optisch dünneren Mediums.....	13
$1/n_F$	Sorptionsexponent nach Freundlich.....	33
n_{H_1}	Hill-Koeffizient für die Gitterstellenbindungsfunktion.....	35
n_{H_2}	Hill-Koeffizient für die Ligandenbindungsfunktion.....	35
N	Fluoreszenzintensität (allgemein).....	16
N_0	Fluoreszenzintensität in Abwesenheit fluoreszierender Moleküle.....	18
\overline{N}_0	mittlere Fluoreszenz des Grundrauschens.....	76

N_a	Fluoreszenz der adsorbierten Proteinmoleküle.....	17
\overline{N}_a	mittlere Fluoreszenz des adsorbierten Proteins im Adsorptionsgleichgewicht.....	91
$N_{a,A}$	Fluoreszenz im Adsorptionsgleichgewicht für den Kinetikanteil der schnell verlaufenden Adsorption.....	88
$N_{a,B}$	Fluoreszenz im Adsorptionsgleichgewicht für den Kinetikanteil der langsam verlaufenden Adsorption.....	88
N_a^e	evaneszenter Anteil der Fluoreszenz der adsorbierten Proteinmoleküle.....	20
N_a^s	Streulichtanteil der Fluoreszenz der adsorbierten Proteinmoleküle.....	20
N_a^{tot}	Gesamtfluoreszenz der adsorbierten Proteinmoleküle.....	20
N_b^e	evaneszenter Anteil der Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle.....	17
$N_b^{e\circ}$	evaneszenter Anteil der Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle ohne Korrektur mit f_F und f_K	112
N_b^s	Streulichtanteil der Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle.....	19
N_b^{tot}	Gesamtfluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle.....	19
$N_{b^*}^e$	evaneszenter Anteil der Fluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle bei Anwesenheit adsorbierter Proteinmoleküle.....	22
$N_{b^*}^{tot}$	Gesamtfluoreszenz der gelösten Proteinmoleküle bei Anwesenheit adsorbierter Proteinmoleküle.....	18
N_{max}	Fluoreszenz beim Vorliegen der maximalen Oberflächenkonzentration	38
N_S^e	evaneszenter Anteil der Fluoreszenz der gelösten Standardmoleküle.....	19
N_S^s	Streulichtanteil der Fluoreszenz der gelösten Standardmoleküle.....	19
N_S^{tot}	Gesamtfluoreszenz der Standardmoleküle.....	18
P	Residualwert.....	69
Q	Quenchfaktor.....	100
$[Q]$	Konzentration des Quenchers.....	11
$[Q]_0$	Konzentration des Quenchers vor Bildung des Fluorophor-Quencher-Komplexes.....	11
r	Innenradius der Kapillare.....	41
r^2	Korrelationskoeffizient.....	57
R	mathematisches Glied in einer Differentialgleichung.....	38
Ra	Rauhigkeit.....	100
Re	Rheynoldzahl.....	39
$\pm S.D.$	Standardabweichung.....	70
$\pm S.E.$	Standardfehler.....	70
t	Zeit.....	24
$t_{1/2}$	Halbwertszeit.....	71
U	Umfang der eintauchenden Probestfläche.....	46

V	Volumen.....	41
\dot{V}	Volumen- bzw. Durchflußrate.....	25
V_{ads}	Adsorptionsgeschwindigkeit.....	41
V_t	lineare Massentransportgeschwindigkeit.....	40
w	Breite einer rechtwinkligen Durchflußzelle.....	25
x	Strömungsrichtung in einer Zelle und Ortskoordinate.....	24
\bar{x}	Mittelwert (allgemein).....	69
x_G	Fehler aus geometrischer Mittelwertbildung.....	69
xy	Fläche senkrecht zur Einfallsnormalen.....	15
y	Strömungsrichtung zum Zellenboden (Vertikale einer Meßzelle) und Ortskoordinate (allgemein).....	24
$y(0)$	Richtung von E_{\perp}^t	15
Y_{max}	Abzissenschnittpunkt.....	100
z	Richtung in der die evaneszente Welle abfällt (Einfallsnormale).....	15
z	Richtung quer zur Strömungsrichtung x in einer Meßzelle (Horizontale der Meßzelle) und Ortskoordinate (allgemein).....	24
α	Interaktionskonstante.....	36
β	Gleitkoeffizient.....	141
β	Interaktionskonstante.....	36
γ	Scherrate.....	25
γ_{krit}	kritische Oberflächenspannung.....	43
γ_l	Oberflächenspannung der Flüssigkeit.....	46
Γ	Gammafunktion.....	26
Γ	Oberflächenkonzentration zum Zeitpunkt t	67
Γ_0	Gleichgewichtsbeladung zum Zeitpunkt $t = 0$	37
Γ_{125_t}	Gleichgewichtsbeladung aus Radioiodexperiment.....	99
Γ_A	Gleichgewichtbeladung im Adsorptionsmaximum für die schneller adsorbierende Konformation.....	125
Γ_B	Gleichgewichtbeladung im Adsorptionsmaximum für die langsamer adsorbierende Konformation.....	125
Γ_C	Anzahl der besetzten Bindungsstellen.....	31
Γ_{max}	Gesamtzahl der freien Bindungsstellen auf der Oberfläche.....	31
Γ_{max}	Oberflächenkonzentration im Adsorptionsgleichgewicht (aus Isotherme)...	36
Γ_{max}	Oberflächenkonzentration im apparenten Adsorptionsgleichgewicht (aus Kinetik) bzw. Endbeladung.....	67
$\Gamma_{max,A}$	Oberflächenkonzentration im apparenten Adsorptionsgleichgewicht für den Kinetikanteil der schnell verlaufenden Adsorption.....	68
$\Gamma_{max,B}$	Oberflächenkonzentration im apparenten Adsorptionsgleichgewicht für den Kinetikanteil der langsam verlaufenden Adsorption.....	68

Γ_p	Oberflächenkonzentration der adsorbierten Proteinmoleküle (Beladung)...	18
Γ_r^S	Sättigungskonzentration der Bindungsstellen auf der Oberfläche.....	35
Γ_{max}^S	Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht (aus Isotherme)....	68
$\Gamma_{max,A}^S$	Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht für die schneller adsorbierende Konformation (aus Isotherme).....	69
$\Gamma_{max,B}^S$	Oberflächenkonzentration im Sättigungsgleichgewicht für die langsamer adsorbierende Konformation (aus Isotherme).....	69
$\Gamma(t)$	Beladung in Abhängigkeit von der Adsorptionszeit.....	36
Γ_{TIRF}	Gleichgewichtsbeladung (allgemein) aus TIRF-Experiment.....	99
Γ_{Vol}	Volumen der adsorbierten Proteinmoleküle.....	17
δ	Dicke der Diffusionsschicht.....	26
δ_N	Nernstsche Diffusionsschicht.....	37
δ_p	Prandtl-Schicht.....	39
Δ	Schichtdicke der adsorbierten Proteinmoleküle.....	17
Δy	Fehler aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz.....	70
ε	Extinktionskoeffizient bei λ_{ex}	8
ε_{max}	Extinktionskoeffizient bei λ_{ex}^{max}	8
ε_p	Extinktionskoeffizient von rhBMP-2 bei $\lambda_{ex} = 280$ nm	57
ε_s	Extinktionskoeffizient von 5-Hydroxy-L-tryptophan bei $\lambda_{ex} = 280$ nm	57
θ	Gleichgewichtsrandwinkel (allgemein).....	42
θ_1	Brechungswinkel im optisch dichteren Medium.....	13
θ_2	Brechungswinkel im optisch dünneren Medium.....	13
θ_{adv}	Vorrückwinkel.....	43
θ_{krit}	kritischer Brechungswinkel.....	13
θ_{rev}	Rückzugswinkel.....	43
Θ_1	fraktionelle Sättigung der Bindungsstellen des Proteins mit den Bindungsstellen der Oberfläche.....	35
Θ_2	fraktionelle Sättigung.....	35
λ_0	Anregungslicht im Vakuum.....	14
λ_2	Anregungslicht im optisch dünnerem Medium.....	14
λ_{abs}	Absorptionswellenlänge.....	59
λ_{em}	Emissionswellenlänge (allgemein).....	16
λ_{em}^{max}	Emissionsmaximum.....	8
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (allgemein).....	8
λ_{ex}^{max}	Absorptionsmaximum.....	8
ν	kinematische Viskosität.....	40
σ_{lg}	Grenzflächenspannung an der Phasengrenze flüssig/gasförmig.....	43

σ_{sg}	Grenzflächenspannung an der Phasengrenze fest/gasförmig.....	43
σ_{sl}	Grenzflächenspannung an der Phasengrenze fest/flüssig.....	43
τ	dimensionslose Kennzahl.....	26
τ	Lebensdauer des angeregten Zustandes bei Kollision.....	11
τ_0	Lebensdauer des angeregten Zustandes ohne Kollision.....	11
τ_F	Relaxationsdauer.....	8
ϑ	Adsorptionskonstante nach Temkin.....	34
v	Strömungsgeschwindigkeit (allgemein).....	24
v_x	Strömungsgeschwindigkeit in x-Richtung.....	24
$v_{x(y)}$	Strömungsgeschwindigkeit in x-Richtung abhängig vom Abstand zur Oberfläche.....	25
$\bar{v}_{x(y)}$	mittlere Fließgeschwindigkeit in x-Richtung, abhängig von y.....	25
$v_{x(z)}$	Strömungsgeschwindigkeit in x-Richtung abhängig vom Abstand zur Oberfläche.....	39
v_y	Strömungsgeschwindigkeit in y-Richtung.....	24
v_z	Strömungsgeschwindigkeit in z-Richtung.....	24
φ	Desorptionskonstante nach Temkin.....	34
Φ	Fluoreszenzquantenausbeute (allgemein).....	16
Φ_a	Fluoreszenzquantenausbeute des adsorbierten Proteins.....	17
Φ_b	Fluoreszenzquantenausbeute des gelösten Proteins.....	17
Φ_F	Fluoreszenzquantenausbeute.....	8

8.2 Publikationen

M. Meißner, H. P. Jennissen (2011) Analysis of Transient Affinity Changes in the Adsorption of Avidin-FITC on immobilized Biotin by Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), *BIOMaterialien*, **12** (1-4), 168.

M. Meißner, S. Madenci, H. P. Jennissen (2010) Real-time kinetics of the binding of rhBMP-2 to polyelectrolyte multilayers on quartz glass, *BIOMaterialien*, **11** (S1), 63.

8.3 Lebenslauf

Name:	Michael Meißner
Geburtstag:	29.4.1966
Geburtsort:	Oberhausen (Rhld)
Schulbildung:	1973-1976: Grundschule in Oberhausen (Rhld)
Berufsausbildung:	1976-1983: Hauptschule Alsfeld in Oberhausen (Rhld)
	1983-1987: Lehre zum Chemielaboranten Ruhrchemie AG in Oberhausen (Rheinland)
Ersatzdienst:	1987-1988: Zivildienst im Evangelischen Altenzentrum am Emscherpark e.V in Essen
Fachabitur:	1987-1989: Erlangung der Fachhochschulreife an der städtischen Kollegschole u. Fachschule für Technik in Duisburg-Nord
weitere Berufsausbildung:	1989-1992: Lehre zum Chemotechniker in Duisburg
Beschäftigung:	1986-1994: Chemielaborant bei der Ruhrchemie AG in Oberhausen (Rhld)
Studium:	1994-2007: Diplomstudium für Chemie an der Universität Duisburg-Essen
Beschäftigung:	1997-2002: wissenschaftliche Hilfskraft im Fraunhofer Institut UMSICHT in Oberhausen (Rhld.)
	2002-2012: Altenpflegehelfer im Evangelischen Seniorenzentrum Essen Kettwig in Essen
Beschäftigung:	2007-2009: Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Physiologische Chemie im Klinikum Essen
Promotion:	2009-2014: Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen

8.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Untersuchung der Bindungskinetiken von
rekombinantem, humanem knochenmorphogenetischen Protein
mit Hilfe der totalen inneren Reflexionsfluoreszenzspektroskopie
unter Berücksichtigung
des Photobleachings und Fluoreszenzquenchings“

selbst verfaßt und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und
daß die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht
wurde.

Essen, im Juni 2014

8.5 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. H. P. Jennissen aussprechen für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Für seine fachliche, praktische und auch menschliche Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken. Zum Erfolg dieser Arbeit hat er maßgeblich beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Barcikowski möchte ich mich für seine Bereitschaft bedanken, sich der Begutachtung meiner Arbeit anzunehmen.

Herrn Dr. A. Kirsch möchte ich dafür danken, daß durch ihn dieses Arbeitsgebiet ermöglicht wurde und daß er sich stets zukunftsorientierten Themen gegenüber offen zeigt.

Herrn Dr. Laub danke ich für seine spontane Hilfe bei allen Angelegenheiten mit dem Computer und zur Beantwortung unzähliger Fragen bezüglich praktischer Vorgehensweisen.

Frau Dr. K. Zurlinden und Frau Dr. S. Madenci danke ich für Vermittlung sämtlichen Wissens in bezug auf praktische Hilfestellungen, die mit dem Thema der Oberflächenmodifizierung und den Umgang mit der Radioaktivität im Zusammenhang stehen.

Herrn Dr. S. Lüers danke ich für die Vermittlung der Arbeitstechniken beim Reinigen und Umgang mit Chromschwefelsäure und der Übermittlung des Wissens über Randwinkel.

Herrn Dr. T. Säger und Frau Dipl.-Chem. J. Holtkamp danke ich für die Konstruktion der Durchflußzellen und des Spincoaters.

Herrn J. Küper danke ich für sämtliches Wissen, das er mir zum Thema Aufreinigung und Quantifizierung von Proteinen vermittelt hat.

Den Mitarbeitern des Hauses Abendfrieden in Kettwig danke ich in Vertretung durch Frau U. Jereb-Proske, daß durch die Rücksichtnahme und entsprechende Einteilung in den Dienstplan die Anfertigung der Dissertation zeitlich vollkommen reibungslos verlief.

Meinen Eltern und meinen Bruder danke ich dafür, daß sie einem stets Durchhaltevermögen vermittelt haben.

Meiner Frau danke ich dafür, daß sie sich in meiner Abwesenheit aufopferungsvoll um unsere Tochter gekümmert hat.